

Effekte von abwasserinduzierten Ionenimbilanzen auf die Reproduktion von Fischen am Beispiel von *Danio rerio*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Marit Wagler

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Werner Kloas

2. Prof. Dr. Helmut Segner

3. PD Dr. habil. Klaus Knopf

Tag der mündlichen Prüfung: 14.08.2019

Diese Dissertation wurde am Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei in
Berlin angefertigt

Abteilung für Ökophysiologie und Aquakultur

Berlin, 2019

Diese Dissertation wurde finanziell durch die
Rosa-Luxemburg-Stiftung
und den
Verband für Angeln und Naturschutz Thüringen e.V.
unterstützt

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Des Weiteren erkläre ich meine Kenntnisnahme der dem angestrebten Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung. Ich habe mich anderweitig nicht um einen Doktorgrad beworben und bin nicht im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades.

Erfurt, März 2019

Marit Wagler

Danksagung

Ich danke an erster Stelle meinen beiden Supervisoren Prof. Dr. Werner Kloas und Dr. Thomas Meinelt für den wertvollen wissenschaftlichen Input, die guten Ratschläge, ihre Geduld und auch für ihren Widerspruch und das Umsteuern im richtigen Moment. Des Weiteren danke ich für die stetige Unterstützung bei der Navigation diverser Verwaltungsvorschriften und der organisatorischen Unterstützung bei der Versuchsplanung. Besonders danke ich auch für Verständnis und Unterstützung während meiner Angehörigenpflegezeit.

Ich danke meinen Arbeits- und Bürokollegen Dr. Matthias Stöck, Konrad Wanka sowie Frederike Keitel-Gröner und Eva Kreuz für wertvolle Diskussionen, gute Tipps, moralische Unterstützung und Eva im Speziellen für die Aufmunterung. Danke für die gute Arbeitsatmosphäre und eure Kollegialität!

Im Besonderen danke ich sehr für die tatkräftige Unterstützung, praktische Hilfestellung und immerwährende Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit und vieles mehr im Labor, am Ort der Tat: Wibke Kleiner, Sascha Behrens, Hans-Jürgen Exner u. A. Ohne euch wäre vieles nicht möglich gewesen! Vielen Dank an Wibke vor allem für die Hilfe bei der Versuchsplanung, dem Primerdesign, der Bestimmung der Genexpression und vieles mehr. Sascha danke ich für seine Hilfe und Unterstützung vor allem bei den Toxizitätstests, der Fischhaltung, der Anleitung der Helfer und Helferinnen und vieles mehr. Hans-Jürgen Exner danke ich für seine Hilfe beim Bestimmen der Ionenkonzentrationen und der Mineralienbestimmung.

Weiterhin danke ich allen Bachelor- und Masterstudentinnen, Praktikantinnen und Lehrlingen, die mir in der einen oder anderen Weise geholfen haben. Dabei danke ich im Besonderen Katja Irob für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Histologie und Cortisolextraktion, Luise Zschesche danke ich für ihre Hilfe in der Durchflussanlage und dem Bestimmen der Eigrößen- und Eiquantitäten sowie Mareike Brehm und Elisabeth Eichler.

Ganz besonders danke ich auch meiner Familie Yvette, Henry, Wendy und Doris Wagler für ihren Zuspruch und ihre Unterstützung.

Schließlich danke ich Juliane Völkel, Nicole Bretschneider, Tilo Kummer, Sylvia Weinowski, Petra Birth, Franziska Kirsch, Carina Wagner und Farid Schwuchow dafür, dass sie an mich glauben.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	IX
Summary.....	XII
Zusammenfassung.....	XIV
1. Einleitung	1
1.1 Anthropogene Versalzung des Werra-Weser-Flussgebietes	1
1.2 Ökologische Auswirkungen der Salzbelastung in der Werra.....	2
1.3 Ionenimbilanzen.....	4
1.4 Auswirkungen auf Süßwasserfische.....	6
1.5 Modellfischart <i>Danio rerio</i>	7
1.6 Ziel der Arbeit	8
2. Material und Methoden	11
2.1 Ionenzusammensetzung und Ionenkonzentrationen.....	11
2.1.1 Einleitung der Abwässer aus der Kalisalzproduktion in die Werra	11
2.1.2 Testmedien.....	12
2.2 Fische und ihre Lebensstadien.....	13
2.3 Indizes 14	
2.3.1 Gonadosomatischer Index (GSI)	14
2.3.2 Relativer Konditionsfaktor (RKF).....	15
2.4 Reproduktionstest.....	15
2.4.1 Elterngeneration.....	18
2.4.1.1 Histologie.....	18
2.4.1.2 Mikroskopische Auswertung Gonaden.....	20
2.4.1.3 Mikroskopische Auswertung der Kiemen	22
2.4.1.4 Ganzkörpercortisol.....	23
2.4.1.5 Genexpressionsanalysen der Hypophysenhormone – Luteini- sierendes Hormon (LH), Follikelstimulierendes Hormon (FSH), Prolaktin (PRO) und Wachstumshormon (GH).....	24
2.4.2 Reproduktionsleistung – Eizellqualität, Eizellgröße, Laichfrequenz und Eizellzahl	28
2.4.3 F1-Generation	29
2.5 Early Life Stage Tests (ELST)	30

2.5.1 Toxikologische Endpunkte	31
2.6 Statistik.....	32
3. Ergebnisse.....	34
3.1 Reproduktionstest.....	34
3.1.1 Einfluss von Ionenungleichgewichten auf die Elterngeneration	34
3.1.1.1 Ovarien.....	34
3.1.1.2 Testes	38
3.1.1.3 Kiemen.....	40
3.1.1.4 Ganzkörpercortisol.....	43
3.1.1.5 Hypophysenhormone	44
3.1.1.6 Gonadosomatischer Index (GSI).....	47
3.1.1.7 Relativer Konditionsfaktor (RKF)	48
3.1.2 Einfluss von Ionenungleichgewichten auf die Reproduktionsleistung ...	49
3.1.2.1 Eiqualität	49
3.1.2.2 Eigröße.....	52
3.1.2.3 Laichfrequenz und Eizahl	52
3.1.3 Einfluss von Ionenungleichgewichten auf die F1-Generation	54
3.1.3.1 Schlupf.....	54
3.1.3.2 Mortalität.....	55
3.1.3.3 Deformationen	56
3.2 Early Life Stage Test (ELST)	59
3.2.1 Schlupf.....	59
3.2.2 Mortalität	60
3.2.3 Deformationen	61
3.2.4 Herzfrequenz.....	64
3.2.5 Mineralgehalt.....	66
3.2.6 Masse, Länge und Relativer Konditionsfaktor (RKF).....	69
4. Diskussion.....	70
4.1 Einfluss von Ionenungleichgewichten auf die Elterngeneration.....	70
4.1.1 Gonaden.....	70
4.1.2 Kiemen.....	72
4.1.3 Cortisol	74
4.1.4 PRL und GH	76
4.1.5 LH und FSH.....	79
4.2 Einfluss von Ionenungleichgewichten auf die Reproduktionsleistung	80
4.3 Einfluss von Ionenungleichgewichten auf die Nachkommen	83
4.3.1 Überlebens-, Schlupf- und Deformationsraten	83
4.3.2 Mineralgehalte und Mineralverhältnisse	85

4.3.3 Herzfrequenzen.....	88
4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick	89
5. Literatur	93

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> (Destilliertes Wasser)
CO	Kortikale/alveoläre Oozyten
dpf	Tage nach der Befruchtung (engl. days post fertilization)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELST	Early Life Stage Test
ELT	Embryo-Larval-Test
EtOH	Ethanol
EV	Frühvitellogene Oozyten
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GH	Wachstumshormon
GSI	Gonadosomatischer Index
HG	Hoher Grenzwert (Exposition)
hpf	Stunden nach der Befruchtung (engl. hours post fertilization)
IR	Interlamellarraum
IR+SF	Interlamellarraum und Primärfilament
K	Kontrolle + Kaliumsulfat (Exposition)
Ktr	Kontrolle: Wasser nach ISO 7346-1 und ISO 7346-2
LH	Luteinisierendes Hormon
LV	Spätvitellogene Oozyten
Mg	Kontrolle + Magnesiumsulfat (Exposition)
MgK	Kontrolle + Magnesium- und Kaliumsulfat (Exposition)
NG	Niedriger Grenzwert (Exposition)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PO	Perinukleolare Oozyten
PRL	Prolaktin
RKF	Relativer Konditionsfaktor
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RT	Reproduktionstest
SD	Standardabweichung
SG	Spermatogonien
SK	Sekundärfilament
SP	Spermatiden
ST	Spermatozyten
TS	Trockensubstanz
VK	Variationskoeffizient
ZF	Zebrafisch(e)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ionenkonzentrationen der Werra am Messpegel Gerstungen (2002 - 2015) auf Grundlage von Messdaten der Thüringer Landesanstalt für Umwelt und Geologie (TLUG), Jena.....	11
Abbildung 2: Schematische Skizze vom Versuchsaufbau: 1 = Stammlösung, 2 = Pumpe, 3 = Rotameter, 4 = Mischkammer, 5 = Laichbox, 6 = Leitungswasserzufluss, 7 = Abfluss, 8 = Zufluss.....	17
Abbildung 3: Mittlere Oozytengrößen der vier verschiedenen Reifestadien: PO = Perinukleolare Oozyten, CO = Kortikale/alveoläre Oozyten, EV = Frühvitellogene Oozyten und LV = Spätvitellogene Oozyten. Die Mittelwerte wurden aus 5 Replikaten (n = 10) pro Expositionsgruppe errechnet. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm dargestellt. Die Expositionsgruppen sind auf der X-Achse dargestellt als: Ktr = Kontrolle, HG = Hoher Grenzwert, NG = Niedriger Grenzwert, MgK = erhöhte Mg^{2+} - und K^{+} -Konzentrationen, Mg = erhöhte Mg^{2+} -Konzentrationen, K = erhöhte K^{+} -Konzentrationen.	34
Abbildung 4: Mittlere Zellanzahl der Oozyten in vier verschiedenen Reifestadien. Die Reifestadien sind jeweils in einem eigenen Diagramm dargestellt: PO = Perinukleolare Oozyten, CO = Kortikale/alveoläre Oozyten, EV = Frühvitellogene Oozyten, LV = Spätvitellogene Oozyten. Dabei wurden der Mittelwert aus den 5 Replikaten (n = 10) pro Expositionsgruppe errechnet. Die Streuung der Daten wurde als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm dargestellt.	36
Abbildung 5: Mittlere relative Häufigkeiten der Spermatozyten in drei verschiedenen Reifestadien: SG = Spermatogonien, SC = Spermatozyten und ST = Spermatiden. Die Mittelwerte wurden aus 5 Replikaten (n = 10) pro Expositionsgruppe errechnet. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm dargestellt.	38
Abbildung 6: Mittelwert der durch Hyperplasien, Epithelabhebungen, Fusionen und Aneurismen beeinträchtigten Kiemenfilamente. Die untersuchten Symptome wurden in die Schweregrade leicht, mittel und schwer unterschieden. Die Mittelwerte wurden aus 5 Replikaten (n = 20) pro Expositionsgruppe errechnet. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm dargestellt.....	40

Abbildung 7: Ganzkörpercortisol der adulten Tiere am Ende des Tests. Mediane, Quartile und Extremwerte (dargestellt als Boxplot) wurden aus 5 Replikaten ($n = 6$) pro Expositionsgruppe errechnet.	43
Abbildung 8: Mittelwerte der relativen m-RNA Expression von Luteinisierendem (LH) und Follikelstimulierendem Hormon (FSH) zum Ende des Tests bei Männchen und Weibchen. Die Mittelwerte werden relativ zu den Kontrollwerten dargestellt. Die Mittelwerte wurden aus 5 Replikaten ($n = 10$) pro Expositionsgruppe errechnet. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm abgebildet.	44
Abbildung 9: Mittelwerte der relativen m-RNA Expression von Wachstumshormon (GH) und Prolaktin (PRL) zum Ende des Tests bei Männchen und Weibchen. Die Mittelwerte (aus 5 Replikaten, $n = 10$ pro Exposition) werden relativ zu den Kontrollwerten dargestellt. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm abgebildet.	45
Abbildung 10: Gonadosomatischer Index von Männchen und Weibchen am Ende des Tests. Die Männchen und Weibchen wurden getrennt erfasst. Mediane, Quartile und Extremwerte (dargestellt als Boxplot) wurden aus 5 Replikaten ($n = 10$) pro Expositionsgruppe errechnet.	47
Abbildung 11: Relative Konditionsfaktoren der Versuchstiere am Beginn und am Ende des Tests. Männchen und Weibchen wurden getrennt erfasst. Mediane, Quartile und Extremwerte (dargestellt als Boxplot) wurden aus 5 Replikaten ($n = 10$) pro Expositionsgruppe errechnet.	48
Abbildung 12: Mittlere Eiquantität über die Gesamtdauer des Tests. Die Eier wurden in vier Merkmalskategorien unterteilt: normal entwickelt, unbefruchtet, deformiert und koagulierte. Die Mittelwerte wurden aus 5 Replikaten ($n = 720$) pro Testgruppe errechnet. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm dargestellt.	49
Abbildung 13: Mittlere Eigröße der Testgruppen über den Gesamttestzeitraum. Die Mittelwerte wurden aus 5 Replikaten ($n = 720$) pro Exposition errechnet. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm dargestellt.	52
Abbildung 14: Kumulative Hazardrate als Wahrscheinlichkeit, dass ein Laichereignis zu einem bestimmten Zeitpunkt auftritt.	53

Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve: Darstellung der Zeit bis zum Schlüpfen der Larven in dpf. Der kumulative, prozentuale Anteil der ungeschlüpften Larven wurde aus 5 Replikaten (n = 50 je Laichereignis) pro Exposition errechnet.	54
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve: Darstellung der Zeit bis zum Sterben der Larven in dpf. Der kumulative, prozentuale Anteil der lebenden Larven wurde aus 5 Replikaten (n = 50 je Legeereignis) pro Exposition errechnet.	55
Abbildung 17: Mittlerer prozentualer Anteil der deformierten Larven nach Schweregraden. Der prozentuale Anteil der deformierten Larven wurde aus 5 Replikaten (n = 50 Embryonen per Laichereignis) pro Exposition über den gesamten Versuchszeitraum errechnet. Die deformierten Larven sind nach Schweregraden unterteilt in: schwach = eine Deformation, moderat = zwei Deformationen und schwer = drei Deformationen.	56
Abbildung 18: Mittlerer prozentualer Anteil der deformierten Larven nach Symptomen. Der prozentuale Anteil der deformierten Larven wurde aus 5 Replikaten (n = 50 Embryonen pro Laichereignis) pro Exposition über den gesamten Versuchszeitraum errechnet. Die deformierten Larven sind nach Symptomen unterteilt in: Ödeme, Wirbelsäulendeformationen, Störungen des Herz-/Kreislaufsystems und Deformationen/Retardationen.	58
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurve: Darstellung der Zeit bis zum Schlüpfen der Larven in hpf. Der prozentuale Anteil der ungeschlüpften Larven wurde aus 3 Replikaten (n = 63) pro Exposition errechnet.	59
Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurve: Darstellung der Zeit bis zum Sterben der Larven in dpf. Der kumulative, prozentuale Anteil der lebenden Larven wurde aus 3 Replikaten (n = 63) pro Exposition errechnet.	60
Abbildung 21: Mittlerer prozentualer Anteil der deformierten Larven nach Schweregraden. Der prozentuale Anteil der deformierten Larven wurde aus 3 Replikaten (n = 63) pro Exposition über den gesamten Versuchszeitraum errechnet. Die deformierten Larven sind nach Schweregraden unterteilt in: schwach = eine Deformation, moderat = zwei Deformationen und schwer = drei Deformationen.	61
Abbildung 22: Mittlerer prozentualer Anteil der deformierten Larven nach Symptomen. Der prozentuale Anteil der deformierten Larven wurde aus 5 Replikaten (n = 63) Embryonen pro Laichereignis) pro Exposition über den gesamten Versuchszeitraum errechnet. Die	

Abbildungsverzeichnis

deformierten Larven sind nach Symptomen unterteilt in: Ödeme, Wirbelsäulendeformationen, Störungen des Herz-/Kreislaufsystems und Deformationen/Retardationen..... 63

Abbildung 23: Mittlere Herzfrequenz der Embryonen im Alter von 48, 72 und 96 hpf. Mediane, Quartile und Extremwerte (dargestellt als Boxplot) wurden aus 3 Replikaten (n = 63) pro Exposition errechnet. 64

Abbildung 24: Mineralgehalte der Fischlarven in mg/g Trockenmasse der ganzen Fische. Die Mittelwerte wurden aus 3 Replikaten (n = 63) pro Exposition errechnet. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm dargestellt. 66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ionenverhältnisse; Gesamthärte und Leitfähigkeit am Messpegel Gerstungen auf Grundlage von Messdaten der TLUG	12
Tabelle 2: Vorgesehene stufenweise Reduzierung der Grenzwerte für die Konzentrationen von Cl^- , Mg^{2+} und K^+ bis 2020	12
Tabelle 3: Übersicht der durchgeführten Tests (Art der Tests, Entwicklungsstadien der Versuchstiere, Testdauer und toxikologische Endpunkte)	14
Tabelle 4: Länge und Masse der Versuchstiere (Mittelwert \pm Standardabweichung)	15
Tabelle 5: Mittelwerte \pm Standardabweichung und Variationskoeffizienten für die Ionenkonzentrationen in den Testwässern	16
Tabelle 6: Physikalisch-chemische Wasserparameter (Mittelwert \pm Standardabweichung)	17
Tabelle 7: Nitrit-N und Ammonium-N (Mittelwert \pm Standardabweichung)	18
Tabelle 8: Entwässerungsprotokoll	19
Tabelle 9: Färbeprotokoll	20
Tabelle 10: Beschreibung der analysierten Reifestadien	21
Tabelle 11: Beschreibung der analysierten Reifestadien	22
Tabelle 12: Übersicht und Beschreibung der analysierten Veränderungen	22
Tabelle 13: Übersicht der Primer-spezifischen PCR-Bedingungen	28
Tabelle 14: Übersicht und Beschreibung der aufgenommenen Deformationsparameter	29
Tabelle 15: Toxikologische Endpunkte und ihre Erfassungszeiten	31
Tabelle 16: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die mittleren Zellgrößen der perinukleolaren, kortikalen/alveolären, frühvitellogenen und spätvitellogenen Oozyten (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)	35

Tabelle 17: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Anzahl der frühvitellogenen und spätvitellogenen Oozyten (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD).....	37
Tabelle 18: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die relative Häufigkeit der spermatogenen Zellen (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD).....	39
Tabelle 19: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für Hyperplasien, Epithelabhebungen und Fusionen der Kiemenfilamente (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD).....	42
Tabelle 20: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Cortisolwerte (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)	43
Tabelle 21: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die relativen m-RNA Expressionen von FSH (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD).....	45
Tabelle 22: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die relativen m-RNA Expressionen von PRL (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD).....	46
Tabelle 23: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Qualitätsmerkmale: deformiert, koaguliert, normal entwickelt und unbefruchtet. (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD).....	51
Tabelle 24: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Eigrößen (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD).....	52
Tabelle 25: Mittelwerte, Standardabweichung und Variationskoeffizienten (VK) der Eianzahl pro Laichereignis sowie die Laichfrequenz als Anzahl der Laichereignisse während des gesamten Testzeitraumes	53
Tabelle 26: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Schlupfwahrscheinlichkeit (Chi-Quadrat-Wert und Signifikanzniveau)	55

Tabelle 27: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Überlebenswahrscheinlichkeit (Chi-Quadrat-Wert und Signifikanzniveau)	56
Tabelle 28: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Deformationsrate (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)	57
Tabelle 29: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Schlupfwahrscheinlichkeit (Chi-Quadrat-Wert und Signifikanzniveau)	60
Tabelle 30: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Sterbewahrscheinlichkeit (Chi-Quadrat-Wert und Signifikanzniveau)	61
Tabelle 31: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Deformationsrate (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)	62
Tabelle 32: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Herzfrequenz (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)	65
Tabelle 33: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Mineraliengehalte (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)	67
Tabelle 34: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Mineralienverhältnisse (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)	68
Tabelle 35: Mittelwerte und Standardabweichung der Längen, Massen und RKF	69

Summary

The potash mining industry produces saline wastewater that leads to increased concentrations of Mg^{2+} , K^+ and Cl^- in the Werra-Weser river system. The ion imbalances caused by potash wastewater and their effects on freshwater fish have hardly been researched. This study examined the effects of ion imbalances on the reproduction of freshwater fish using the *Danio rerio* fish model. The fish were exposed to five different combinations of increased ion concentrations, adapted to the current threshold values for the discharge of potash mining wastewater. In two exposures the concentrations of Cl^- , Mg^{2+} and K^+ were the same as the current threshold values for wastewater discharge – high limit value (HG): 2.5 g/l Cl^- , 0.20 g/l K^+ and 0.34 g/l Mg^{2+} and low limit value (NG): 1.7 g/l Cl^- , 0.15 g/l K^+ and 0.23 g/l Mg^{2+} as legal threshold values from 2020 onwards. In addition, increased potassium concentrations (K): 0.20 g/l K^+ , increased magnesium concentrations (Mg): 0.34 g/l Mg^{2+} and increased magnesium and potassium concentrations (MgK): 0.34 g/l Mg^{2+} + 0.20 g/l K^+ were tested. During a partial life cycle test, adult fish were exposed to these ion concentrations for 35 days and then their offspring were exposed in an embryo larval test (ELT) from egg spawning until the ninth day post fertilization (dpf). Moreover, a 21-day early life stage test (ELST) was carried out on offspring from non-exposed parents.

In the adult zebrafish (ZF), the salt exposure led to rather weak to moderate effects on most of the endpoints examined. The hyperosmotic stress in the animals exposed to salt led to thickening of the gill epithelium due to hyperplasia, epithelial detachments and filament fusions. The cortisol levels of the animals in the HG and K exposure were increased even after six weeks of exposure. However, significant effects on the gene expression of the mineral corticoid prolactin could only be found in the males. The males of the HG and NG showed significantly lower expressions of prolactin than the ZF of the Mg.

Both in the examination of the pituitary hormones and in the comparison of the condition factors at the end of the test, significant effects were found only in the males. Of the examined gonadotropins LH and FSH, the males of the NG had a significantly higher gene expression of FSH than those of the K. The relative condition factors of the males of the HG were significantly higher than of those of the K exposure.

Histological examinations of the gonads were carried out with regard to the size and frequency of the gonadal cells in the different stages of maturity. Effects could be found in all

salt exposures except the HG. However, the effects are erratic, vary considerably and do not allow for a general statement. In the perinucleolar, cortical / alveolar and early vitellogenic stage, the oocytes of the animals of the MgK were significantly smaller than of the animals of the control. In the late vitellogenic maturity stage, the oocytes of the K were significantly larger. These results were partly reflected in the cell numbers. Significantly more early vitellogenic oocytes were found in the animals of the MgK and significantly more late vitellogenic oocytes in the NG. In the male animals, the salt exposure led to increased relative frequencies of spermatogonia, spermatocytes and spermatids compared to the control. These differences were not always significant except for the exposure to Mg.

Keywords: secondary salinization, Werra, waste water, potash mining, freshwater fish, *Danio rerio*, early life stage test, reproduction test, partial life cycle test, ion imbalances, cortisol, polactin, growth hormone, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, gill morphology, gonadal morphology

Zusammenfassung

Die Kalibergbau-Industrie produziert salzreiche Abwässer, die zu erhöhten Konzentrationen von Mg^{2+} -, K^+ - und Cl^- im Werra-Weser-Flusssystem führen. Die durch die Kaliabwässer verursachten Ionenimbilanzen und ihre Wirkung auf Süßwasserfische sind kaum erforscht. In dieser Studie wurden die Auswirkungen von Ionenungleichgewichten auf die Fortpflanzung von Süßwasserfischen unter Verwendung der Fischmodellart *Danio rerio* untersucht. Die Fische wurden in fünf verschiedene Kombinationen von erhöhten Ionenkonzentrationen, angepasst an die aktuellen Schwellenwerte für die Einleitung der Kalibergbau-Abwässer, exponiert. In zwei Expositionen wurden die Konzentrationen von Cl^- , Mg^{2+} und K^+ wie in den aktuellen Grenzwertbestimmungen verwendet – hoher Grenzwert (HG): 2,5 g/l Cl^- , 0,20 g/l K^+ und 0,34 g/l Mg^{2+} und niedriger Grenzwert (NG): 1,7 g/l Cl^- , 0,15 g/l K^+ und 0,23 g/l Mg^{2+} als vorgeschlagene Grenzwerte ab dem Jahr 2020. Darüber hinaus wurden erhöhte Kaliumkonzentrationen (K): 0,20 g/l K^+ , erhöhte Magnesiumkonzentrationen (Mg): 0,34 g/l Mg^{2+} und erhöhte Magnesium- und Kaliumkonzentrationen (MgK): 0,34 g/l Mg^{2+} + 0,20 g/l K^+ geprüft. Während eines partiellen Lebenszyklustests wurden adulte Fische 35 Tage diesen Ionenkonzentrationen ausgesetzt und anschließend deren Nachkommen in Embryo-Larval-Test (ELT) vom Ablachen der Eier bis zum neunten Tag nach der Befruchtung (dpf) exponiert. Zusätzlich wurde ein 21 Tage Early Life Stage Test (ELST) mit Nachkommen von nicht exponierten Eltern durchgeführt.

Die Salzexpositionen führten bei den adulten Zebrabärblingen (ZF) eher zu schwachen bis moderaten Effekten auf die meisten untersuchten Endpunkte. Der hyperosmotische Stress führte bei den Tieren der Salzexpositionen zu Verdickungen des Kiemenepithels durch Hyperplasien, Epithelabhebungen und Filamentfusionen. Selbst nach sechs Wochen Exposition waren die Cortisolwerte der Tiere in der HG- und K-Exposition erhöht. Allerdings konnten nur bei den Männchen signifikante Effekte auf die Gen-Expression des Mineralcorticoids Prolaktin festgestellt werden. Die Männchen der HG und NG wiesen signifikant geringere Expressionen von Prolaktin auf als die ZF der Mg.

Sowohl in der Untersuchung der Hypophysenhormone als auch im Vergleich der Konditionsfaktoren am Ende des Tests wurden nur bei den Männchen signifikante Effekte festgestellt. Von den untersuchten Gonadotropinen LH und FSH wiesen die Männchen der NG eine signifikant höhere Genexpression von FSH auf als die der K. Die relativen Konditionsfaktoren der Männchen der HG waren signifikant höher als bei der K-Exposition.

Histologische Untersuchungen der Gonaden wurden bezüglich der Größe und Häufigkeiten der Gonadenzellen in den unterschiedlichen Reifestadien durchgeführt. In allen Salzexpositionen außer der HG konnten zum Teil Effekte festgestellt werden. Die Effekte sind allerdings erratisch, variieren stark und lassen keine generelle Aussage zu. Im perinukleolaren, kortikalen/alveolären und frühvitellogenen Stadium waren die Oozyten der Tiere der MgK signifikant kleiner als bei den Tieren der Ktr. Im spätvitellogenen Reifestadium waren die Oozyten der K signifikant größer. Diese Ergebnisse spiegelten sich zum Teil in den Zellanzahlen. Bei den Tieren der MgK wurden signifikant mehr frühvitellogene Oozyten und bei der NG signifikant mehr spätvitellogene Oozyten festgestellt. Bei den männlichen Tieren führten die Salzexpositionen zu gegenüber der Ktr erhöhten relativen Häufigkeiten von Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatiden. Diese Unterschiede waren außer bei der Mg-Exposition nicht immer signifikant.

Die Effekte der verschiedenen Salzexpositionen auf die Reproduktionsleistung der Elterntiere und die Entwicklung ihrer Nachkommen waren wesentlich stärker als auf die adulten Tiere selbst. Es wurde eine eindeutige Beeinträchtigung der Reproduktion festgestellt. Die Effekte auf die Laichfrequenz und die mittlere Anzahl der Eier pro Gelege waren eher schwach. In der HG-Exposition wurde jedoch ein nahezu vollständiger Verlust der Nachkommenschaft durch eine über 90%ige Hemmung der normalen Eientwicklung festgestellt. Auch in der NG-Exposition waren nur 20 % der Eier normal entwickelt, bei der Mg-Exposition 26 %. Die Ktr wies im Vergleich im Mittel 75 % normal entwickelte, befruchtete Eier auf.

In dem ELT und ELST wurden bei den Expositionen im Vergleich zur Ktr verfrühte und verlängerte Schlupfzeiten, verringerte Überlebensraten und erhöhte Deformationsraten und Herzfrequenzen festgestellt. Es wurden ebenfalls leichte Verschiebungen im Mg-, Ca-, K- und Na-Haushalt der Larven festgestellt. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass Teillebenszyklus-Tests besser geeignet sind, die Auswirkungen von durch Kaliabwasser verursachten Ionenungleichgewichten auf die Fortpflanzung und frühe Entwicklung von Fischen zu untersuchen. Standard-ELT und -ELST mit Nachkommen nicht exponierter Eltern lassen Erkenntnisse über wichtige Effekte von erhöhten Ionenkonzentrationen und -imbalancen auf die Gameten und die Befruchtung nicht zu.

Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass Ionenstress moderate Auswirkungen auf eine Vielzahl biologischer Parameter in den adulten Fischen auslöst. Diese weisen auf eine für die adulten Tiere selbst ausreichende Anpassungsleistung an erhöhte Ionenkonzentrationen und

dadurch verursachte Ionenimbalancen hin. In Betrachtung der starken Effekte auf die Reproduktion, die verminderte Reproduktionsleistung und die Beeinträchtigungen der Larval- und Embryonalentwicklung der Nachkommen ist der metabolische Energieaufwand zur Anpassung der Osmoregulation zu groß, um eine ausreichende Reproduktion zu gewährleisten. Die Ergebnisse der Modellfischart Zebrafisch lassen darauf schließen, dass eine ausreichende Reproduktion von Süßwasserfischen unter den untersuchten Grenzwerten nicht möglich ist. Die Ergebnisse wurden unter Laborbedingungen, d. h. unter Idealbedingungen für die relativ salzstresstolerante, robuste Süßwasserfischart *Danio rerio* erzielt. Unter natürlichen Bedingungen ist von einer hohen Unterschiedlichkeit der Salzstresstoleranz einheimischer Fischarten auszugehen. Des Weiteren müssen zusätzliche Beeinträchtigungen der Gewässer-morphologie und damit der Lebensräume und Laichplätze sowie Beeinträchtigungen der Gewässerchemie – durch Einträge landwirtschaftlicher, häuslicher oder industrieller Abwässer – in zukünftige Überlegungen zur Grenzwertsetzung miteinbezogen werden.

Schlagwörter: Sekundäre Versalzung, Werra, Abwässer, Kalibergbau, Süßwasserfische, *Danio rerio*, Early-Life-Stage-Test, Reproduktionstest, Partieller Lebenszyklustest, Ionenimbalancen, Cortisol, Polaktin, Wachstumshormon, Follikelstimulierendes Hormon, Luteinisierendes Hormon, Kiemenmorphologie, Gonadenmorphologie

1. Einleitung

1.1 Anthropogene Versalzung des Werra-Weser-Flussgebietes

Anthropogen verursachte (sekundäre) Versalzung rangiert weltweit unter den wichtigsten Stressoren von Süßwasserökosystemen mit stetig wachsender globaler Bedeutung. Neben der durch die landwirtschaftliche Bewässerung verursachten Versalzung in ariden Gebieten ist der Kohle- und Düngesalzbergbau Hauptverursacher sekundärer Versalzung (Cañedo-Argüelles, Kefford u.a. 2013). In Deutschland verursacht die Gewinnung von Düngesalzen eine deutliche Versalzung des Werra-Weser-Flusssystem.

Seit über einhundert Jahren wird im hessisch-thüringischen Kalirevier an der Werra Kalisalz überwiegend als Rohstoff für Düngemittel gewonnen. Die Einleitung der Salzabwässer in diesen Gebieten begann schon 1901 (Vogel 1913) und erreichte in den 1970er und 1980er Jahren Spitzenkonzentrationen bis zu 40.000 mg/l Cl^- , 986 mg/l Mg^{2+} und 584 mg/l K^+ (Hübner 2007).

Die Grenzwertfestsetzung für die Einleitung der salzbelasteten Abwässer änderte sich dabei ständig. Nachdem durch die Salzbelastung der Werra und Weser die Trinkwasserversorgung gefährdet wurde, erfolgte 1917 die erste Grenzwertfestsetzung durch das Reichsgesundheitsamt für Chlorid (842,5 mg/l) und die Gesamthärte (48,2°dH). In der Zeit des Zweiten Weltkriegs wurde die Kaliproduktion als kriegswichtig eingestuft. Auf dieser Grundlage erfolgte durch die Kaliabwässerkommission die Festlegung eines Grenzwertes für Chlorid in Höhe von 2500 mg/l und einer Gesamthärte in Höhe von 50°dH für die Werra. Nach dem Krieg wurden die Grenzwerte 1947 bestätigt. Während die Kaliindustrie auf hessischer Seite ihre Abfälle vor allem auf Halden brachte oder Abwässer in den Untergrund versenkte, wurden die Abwässer der Kaliindustrie der DDR vor allem in die Werra eingeleitet. Konzentrationen von rund 40 g/l Cl^- ließen das Leben von Süßwasserorganismen im Bereich unterhalb der Einleitungen nicht mehr zu. Nach der deutschen Wiedervereinigung nahmen die eingeleiteten Salzmenngen aufgrund wirtschaftlicher Umstrukturierungen und der Zusammenführung der vormals getrennten Unternehmen Kali und Salz AG und Mitteldeutsche Kali AG zur Kali und Salz GmbH stark ab. Seit 2000 ist die Kaliindustrie verpflichtet, die Einleitung der Laugenabwässer dem Wasserstand der Werra anzupassen (Hübner 2007). Dadurch erfolgte eine Nivellierung der Spitzenlasten. Aktuell bestehen für die Einleitung von Laugen-

Einleitung

abwässern folgende Grenzwerte: 2.500 mg/l Cl^- , 340 mg/l Mg^{2+} , 200 mg/l K^+ und 90 °dH Gesamthärte. Diese Werte gelten für Gerstungen, dem Ort der höchsten Konzentration von Kaliabwässern in der Werra. Bis zum 31.12.2020 sollen diese Werte auf 1.700 mg/l Cl^- , 230 mg/l Mg^{2+} und 150 mg/l K^+ reduziert werden.

Unternehmen der hessisch-thüringischen Kaliindustrie sind vornehmlich an der Gewinnung des Düngesalzes Kaliumchlorid und anderen wirtschaftlich relevanten Salzen wie Kaliumsulfat, Natriumsulfat, Magnesiumsalzen und dem Element Brom interessiert. Bei der chemischen Produktion dieser Salze entstehen als Abfallprodukte Laugenabwässer und Abraumsalzhalden. Der Eintrag der Salzfrachten ins Oberflächengewässer geht sowohl von den industriellen Abwässern als auch von den durch Niederschlag gelösten Salzabwässern der Halden aus. Die Kalilauge wird einerseits ins Fließgewässer eingeleitet, andererseits wird sie in wasserführende Gesteinsschichten im Untergrund verpresst. Diese verpressten Abwässer treten dann an verschiedenen Stellen wieder zu Tage und sorgen dadurch für einen diffusen Salzeintrag ins Fließgewässer. Betroffen sind vor allem die Gebiete der Flüsse Ulster, Werra und Weser. Da die Belastung durch die Kaliabwässer ähnlich wie die Nährstoffbelastung in den 1990er Jahren zurückgegangen ist, konnte auch tatsächlich eine Verbesserung des ökologischen Zustandes der betroffenen Flusslebensgemeinschaften festgestellt werden. Legt man allerdings eine natürliche Beschaffenheit der Werra mit einer Chloridkonzentration von max. 100 mg/l und 14 °dH (Regierungspräsidium Kassel, 2003) zugrunde, wird deutlich, wie weit die festgelegten Grenzwerte vom potenziell natürlichen Wasserzustand entfernt sind.

1.2 Ökologische Auswirkungen der Salzbelastung in der Werra

In einer Studie zu den NaCl-dominierten anthropogenen Versalzungen in Australien wurden ab einem Schwellenwert von 1000 mg/l Süßwasserorganismen merkbar beeinträchtigt (Nielsen, Brock u.a. 2003). Untersuchungen zum ökologischen Zustand des Makrozoobenthos im belasteten Gebiet belegen eindeutig eine durch die Salzeinleitung verursachte Beeinträchtigung. Da benthische Organismen im Gegensatz zur Fischfauna nicht durch Maßnahmen wie Besatz oder Entnahme beeinflusst werden können und ausschließlich von den Umweltbedingungen im Gewässer vor Ort beeinflusst werden, eignet sich der Makrozoobenthos besonders dazu, die Schädigung des Flussökosystems durch die anthropogene Salzeinleitung zu beurteilen. Im Abschlussbericht des Institutes für Gewässerökologie und Fischereibiologie Jena wurde eindeutig festgestellt, dass der ökologische Zustand der Werra

unterhalb der Salzeinleitung signifikant schlechter ist als oberhalb (Wagner 2009). Der ökologische Zustand in den unbelasteten Teilen der Werra übertrifft dabei noch den von unbelasteten Vergleichsgewässern wie Fulda, Diemel, Unstrut und Saale, die in Thüringen und Hessen untersucht wurden. Eine Beeinträchtigung des Makrozoobenthos, die der Salzeinleitung vorausgeht, kann ausgeschlossen werden. Es ist erwiesen, dass die Salzkonzentration vor allen anderen Einflussfaktoren – wie mineralischen und organischen Nährstoffbelastungen und dem Zustand der Gewässerstruktur – Hauptursache für den schlechten Zustand des Makrozoobenthos ist (Braukmann und Böhme 2011, Wagner 2009).

Die Anzahl der gefundenen Arten war in den belasteten Gewässerteilen weitaus geringer als vor der Einleitung. In größeren Abundanzen traten vor allem Neozoen wie die Krebse *Gammarus tigrinus* (als Fischnährtier für Forellen eingesetzt) und *Corophium lacustre* sowie die Neuseeländische Topfdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* auf. Dabei dominierte die häufigste Art *Gammarus tigrinus* die Lebensräume zum Teil sehr stark. Neben diesen drei Arten nahmen andere Arten einen sehr geringen Anteil an der Gesamtindividuenzahl ein bzw. wurden häufig nur als Einzelexemplare festgestellt (Wagner 2009). Einige dieser Taxa könnten aus den nicht salzbelasteten Seitenarmen der Werra und Weser eingewandert sein, sich jedoch im belasteten Fließgewässer nicht vermehren bzw. eine stabile Population bilden.

Die Fischfauna der salzbelasteten Werra ist gegenüber der potenziell natürlichen Situation (Hübner, 2002) nach den Untersuchungen von Schwevers, Adam u.a. (2005) sowie Matthes und Werner (2012) als verarmt zu bezeichnen. Nach diesen Ergebnissen fehlt eine ganze Reihe angestammter Arten und Leitfischarten der Flussregion völlig. Der unterentwickelte Fischbestand der Werra, der zudem durch eine schlechte Kondition gekennzeichnet ist (beeinträchtigter Gesundheitszustand, vermehrtes Auftreten von Geschwüren), gründet sich wahrscheinlich nur auf die Reproduktion der Fische in unbeeinträchtigten Seitenarmen und Fischbesatz (Schwevers, Adam u.a. 2005). Nur für einen Teil der erfassten Fischarten wurde eine natürliche Reproduktion nachgewiesen. Der Fischbestand wurde über Besatzmaßnahmen gestützt (Schwevers, Adam u.a. 2005). Eine Vielzahl der Fische wies Fischkrankheiten auf.

Die natürliche Salinität ist allein durch den Einfluss des Wetters niemals ganz konstant. Eine zusätzlich erhöhte, fremdinduzierte Schwankung der Salinität bedeutet erhöhten Anpassungsstress für Süßwasserorganismen. Sowohl eine erhöhte Amplitude als auch Frequenz der Salinitätsschwankung führte beispielsweise bei Süßwassermakroinvertebraten zu größeren Effekten, als die gleiche Salzmenge in konstanter Konzentration (Marshall und Bailey 2004).

Einleitung

Die Reaktionskurven von Reproduktion, Wachstum und Entwicklung von Süßwasserorganismen und -fischen in Bezug auf die Salinität ähneln häufig einem umgedrehten U. Sowohl zu niedrige als auch zu hohe Salinität zeigen limitierende Effekte (Boeuf und Payan 2001, Kefford, Dunlop u.a. 2007). In einer vergleichenden Studie tolerierten euryhaline Wasserorganismen toxische Bedingungen am besten unter isoosmotischen Salinitäten, da der osmotische Stress unter diesen Bedingungen am geringsten ist (Hall und Anderson 1995).

Neben den eingebrachten Salzfrachten tragen auch andere Faktoren zur ökologischen Belastung der Werra bei. Die Gewässermorphologie der betroffenen Flüsse ist stark anthropogen überformt. Neben den Salzeinleitungen werden auch organische Nährstoffe, Stickstoff und Phosphor durch industrielle, landwirtschaftliche und häusliche Abwässer eingetragen. Während die Toxizität verschiedener Metalle bei steigender Salinität eher sinkt, kann eine erhöhte Salinität zu einer Erhöhung der toxischen Effekte organischer Chemikalien wie z. B. Organophosphat-Insektiziden führen (Hall und Anderson 1995).

1.3 Ionenimbilanzen

Ursächlich für den schlechten ökologischen Zustand der Werra sind neben dem Chloridgehalt auch die Verschiebungen im $Mg^{2+}:Ca^{2+}$ - und $K^+:Ca^{2+}$ -Verhältnis. Ausschlaggebend für die Präsenz heimischer Gammariden ist ein Überschuss des Ca^{2+} , der in den salzbelasteten Teilen der Werra nicht gegeben ist. In Albrecht (1954) und Ebeling (1933) wird auf die entgiftende, kompensatorische Wirkung des Ca^{2+} gegenüber Mg^{2+} und K^+ hingewiesen. Für ein unbelastetes Gewässer mit den typischen Lebensgemeinschaften wird ein $K^+:Ca^{2+}$ -Verhältnis von $< 0,1$ und ein $Mg^{2+}:Ca^{2+}$ -Verhältnis von höchstens $< 0,3$ angegeben (Jürgen Albrecht 1984). In der Werra bei Gerstungen sind jedoch weit höhere Stoffmassen an Mg^{2+} als an Ca^{2+} vorhanden. Diese unnatürlichen Mg^{2+} -Konzentrationen sind ökologisch sehr problematisch. Besonders die schädliche Wirkung auf heimische Mollusken ist bekannt (Neumann 1962).

Aus ökologischer Sicht besonders bedenklich sind die hohen K^+ -Konzentration in den salzbelasteten Gewässern zu bewerten. K^+ wirkt in hoher Konzentration auf viele Organismen toxisch und schädigt vor allem die Fischfauna schon bei einer dauerhaften Konzentration von 80 mg/l (Halsband 1976). Außerdem setzt es die Salzverträglichkeit vieler Organismen noch zusätzlich herab (z. B. Schmitz und Kneissl (1967), Nemenz (1970)).

Alle natürlichen Gewässer enthalten mehr oder weniger in ihnen gelöste anorganische Ionen. Die Gesamtkonzentration dieser Ionen wird als Salinität bezeichnet (Williams und Sherwood 1994). Der natürliche Salzgehalt im Meerwasser ist relativ konstant und beträgt zwischen 33 und 37 g/l. Mehr als 85 % der gesamten dort gelösten Ionen sind Na^+ und Cl^- (Consoli, Allen u.a. 1993). Andere Hauptbestandteile des Meerwassers sind die Kationen Mn^{2+} , K^+ und die Anionen Ca^{2+} , Br^- , SO_4^{2-} und HCO_3^- . Im Süßwasser dominieren dagegen Ca^{2+} und in geringerem Maße Mg^{2+} als Hauptionen und Härtebildner.

Die Klassifizierung der Gewässer nach der Ionenkonzentration erfolgt nach dem Venedig-System in folgende Gruppen: limnisch $< 0,5$ g/l oligohalin $0,5 - 4$ g/l, mesohalin $5 - 18$ g/l polyhalin $18 - 30$ g/l, euhalin $30 - 40$ g/l und hyperhalin > 40 g/l (1958, Cañedo-Argüelles, Kefford u.a. 2013). Direkt kann Salinität nur über die Analyse der Gesamtionenzusammensetzung bestimmt werden. Wasserparameter wie Konduktivität und TDS (Summe der gelösten Salze; engl. total dissolved solids) dienen zwar meist zur Messung der Salinität, können aber nur bedingt verwendet werden, um Aussagen über die Toxizität von Gewässern in Bezug auf Süßwasserorganismen zu treffen.

Süßwasserorganismen haben unterschiedliche Toleranzbereiche für die einzelnen Ionenspezies (Dunlop, McGregor u.a. 2005). Diese sind entscheidend von der Ionenzusammensetzung – also den Einzelionenkonzentrationen und den Ionenverhältnissen – abhängig (Mount, Gulley u.a. 1997). In Ca^{2+} - und HCO_3^- -reichen Gewässern können bei gleicher Konduktivität mehr sensitive Süßwasserarten überleben als in NaCl -reichen Gewässern (Dunlop, McGregor u.a. 2005). Außerdem ist das Verhältnis der monovalenten Ionen K^+ und Na^+ zu den divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} angesichts der Toxizität von erhöhten Salzgehalten für Süßwasserorganismen wichtiger als der Gesamtionengehalt (Bayly 1968). Die relative Ionentoxizität der Gewässerhauptionen wurde bei Süßwasserorganismen wie folgt festgestellt: $\text{K}^+ > \text{HCO}_3^- \approx \text{Mg}^{2+} > \text{Cl}^- > \text{SO}_3^{2-}$ (Mount, Gulley u.a. 1997). Die Toxizität der Kationen Ca^{2+} und Na^+ ist eher gering und wird von den assoziierten Anionen determiniert.

Die direkte und indirekte Einleitung der Abwässer aus dem Kalibergbau führt zu einer stark erhöhten Salinität und einer unausgewogenen Ionenzusammensetzungen des Gewässers. Besonders das hohe $\text{Mg}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$ -Verhältnis und die erhöhte Kaliumbelastung sind ökologisch äußerst bedenklich. Die stark verarmte Biodiversität und die hohe Überfremdung des Gewässersystems sind die Folgen. Außerdem wird durch die starke Beeinträchtigung der

Gewässerorganismen die natürliche Selbstreinigungskraft des Gewässers herabgesetzt.

1.4 Auswirkungen auf Süßwasserfische

Adulte Teleostier können die Ionenkonzentrationen ihrer Körperflüssigkeiten relativ unabhängig von den Konzentrationen im Außenmedium konstant halten und somit relativ hohe NaCl-Konzentrationen von 10.000 mg/l (Hart, Bailey u.a. 1991) bis sogar 13.000 mg/l (Bacher und Garnham 1992) tolerieren. In früheren Lebensstadien sind Süßwasserfische allerdings deutlich sensibler als adulte Fische (Hart, Bailey u.a. 1991). Auch die Gameten von Süßwasserfischen wie Sperma (Whiterod 2006) und Fischeier direkt vor der Aushärtung (Chotipuntu 2003) sind salzempfindlicher als sich entwickelnde Embryonen, die von dem Chorion nach der Befruchtung zum Teil geschützt werden (Alderdice 1988). Die Ionendurchlässigkeit der Eihülle nimmt mit dem Alter des Embryos zu, bleibt aber geringer als vor der Befruchtung (Mangor-Jensen 1986, Varsamos, Nebel u.a. 2005). Während der Larvalentwicklung steigt zudem die Salinitätstoleranz durch die Verlagerung der osmoregulatorischen Funktion von der Haut zu den Kiemen, dem Hauptorgan der Osmoregulation (Varsamos, Nebel u.a. 2005). Die Salzverträglichkeit von Fischen ist die Summe ihrer Fähigkeit, sich in jeglichem Lebensstadium an die sie umgebende Salinität anzupassen. Bei den meisten Arten sind Befruchtung, Embryonal- und Larvalentwicklung, die Resorption des Dottersacks, das Befüllen der Schwimmblase und das Wachstum der Larven abhängig vom Salzgehalt (Boeuf und Payan 2001). Adulte Süßwasserfische vertragen im Vergleich zu den empfindlichen frühen Lebensstadien relativ hohe Salinitätsniveaus. Hier sind ab bestimmten Salzkonzentrationen subletale Effekte wie Wachstums- und Entwicklungsstörungen und eine Verminderung der Reproduktion (Hart, Bailey u.a. 1991, Kefford, Dunlop u.a. 2007) feststellbar.

Zur Toxizität von oder zur Stressinduktion durch erhöhte Mg^{2+} -Konzentrationen sind bisher keine Angaben in der Literatur zu finden. Gleiches gilt für Erkenntnisse dazu, wie sich das Verhältnis von K^+ und Mg^{2+} und das Verhältnis von Mg^{2+} und Ca^{2+} auf die Stress- bzw. Reproduktionsphysiologie bei Fischen auswirkt. Informationen zur Fischtoxizität von Mg^{2+} und oder K^+ sind momentan kaum in der Literatur zu finden.

Es ist bekannt, dass K^+ die Salzverträglichkeit vieler Organismen herabsetzt (z. B. Schmitz und Kneissl (1967), Nemenz 1970), in hoher Konzentration toxisch auf viele Organismen wirkt und insbesondere auch die Fischfauna schädigt. Nach Halsband (1973) bewirkt eine

dauerhafte Kaliumkonzentration von mehr als 80 mg/l eine Schädigung von Fischen. Nach dem Regierungspräsidium Kassel (2006) wurden an der Messstelle Gerstungen im Jahr 2005 Kaliumkonzentrationen von im Mittel 143 mg/l und im Maximum 210 mg/l festgestellt. Peterson, Martin-Robichaud u.a. (1988) untersuchten die Toxizität einiger Salze, die in kanadischen Kaliabwässern enthalten sind. K^+ zeigte bei dieser Untersuchung die stärkste toxische Wirkung und war schon in einer Konzentration von 16 mM toxisch. Fischplasma enthält normalerweise nicht viel mehr als 2 mM K^+ (Wood, McDonald u.a. 1982). Abnormal hohe Kaliumkonzentrationen in den extrazellulären Flüssigkeiten setzen das Membranpotenzial speziell der Herzmuskeln kritisch herab. Das Resultat kann Tod durch Herzversagen aufgrund der verlorenen Kontraktilität des Herzmuskels sein. Erste Untersuchungen von Meinelt und Stüber (2009) zur Wirkung von K^+ auf frühe Entwicklungsstadien von Zebra-bärblingen ergaben eine akute Toxizität schon ab 2 ‰.

1.5 Modellfischart *Danio rerio*

Der Zebra-bärbling *Danio rerio*, oder auch Zebrafisch (ZF) genannt, gehört zur Familie der Karpfenfische (Cyprinidae). Die tropische Fischart kommt ursprünglich aus dem Flussgebiet des Ganges. Die Wildform der ZF bevorzugt eher stehende oder ruhige Gewässer wie Kanäle, Teiche, Gräben und Reisfelder gegenüber fließenden Gewässer (McClure, McIntyre u.a. 2006). Zebra-bärblinge sind Allesfresser. Sie ernähren sich hauptsächlich von Zooplankton, Insekten, Spinnentieren und Wirbellosen, aber auch von Phytoplankton, Algen und Pflanzen (R Spence, Fatema u.a. 2007). ZF erreichen eine Länge von drei bis vier cm und ein Alter von zwei bis drei Jahren in Gefangenschaft.

Bei einer Wassertemperatur von 25,5°C erreichen ZF ca. 75 Tage nach der Befruchtung (dpf; engl. days post fertilization) ihre Geschlechtsreife (Eaton und Farley 1974). Werden Männchen und Weibchen zusammen gehalten, laichen sie ganzjährig. Zebrafische sind azyklische Dauerlaicher. Die Intervalle zwischen zwei Laichereignissen variieren von einem bis sechs Tagen mit einem Mittelwert von 1,5 Tagen. Die Gelegegrößen variieren von einem bis 700 Eiern mit einem Mittelwert von 185 (\pm SD 149) (Spence und Smith 2008). Die Anzahl der Eier pro Gelege ist positiv mit der Körpergröße der Weibchen und dem Zeitintervall zwischen zwei Laichereignissen korreliert (Eaton und Farley 1974). Geschlechtsreife Männchen induzieren durch ihre Pheromone die Ovulation bei den Weibchen, welche alle reifen Eier mit einem Mal ablaichen (Hurk, Schoonen u.a. 1987). Nach der Ovulation sondern

Einleitung

die Weibchen ebenfalls Hormone ab, die bei den Männchen Paarungsverhalten auslösen (Hurk, Schoonen u.a. 1987). Das Ablaichen ist mit dem Licht-Dunkel-Zyklus der Tiere assoziiert. Es findet in den ersten Minuten eines Lichtreizes bis zu einer Stunde nach einer längeren Dunkelperiode statt (Darrow und Harris 2004). ZF laichen im freien Wasser. Als Laichsubstrat werden Pflanzen oder Kies bevorzugt. Die nicht adhäsiven Eier sinken zu Boden. Sie sind ca. 0,7 mm groß. Die Eier werden durch Wasserkontakt aktiviert und durchlaufen auch ohne Befruchtung mehrere Entwicklungsschritte bis kurz vor der ersten Zellteilung (Lee, Webb u.a. 1999). Die Larven schlüpfen in Laborbedingungen bei 28,5°C zwischen 48 und 72 Stunden nach der Befruchtung (hpf; engl. hours post fertilization) (Rowena Spence, Ashton u.a. 2007). Nach dem Schlüpfen heften sich die Larven mit speziellen Kopfdrüsen an feste Oberflächen (Laale 1977). Die Schwimmblase der Larven wird ab einem Alter von 72 hpf aktiv befüllt (Goolish und Okutake 1999). Danach beginnen die Larven frei zu schwimmen und Nahrung aufzunehmen (Kimmel, Ballard u.a. 1995).

ZF sind im Hinblick auf die Salinität relativ tolerant und tolerieren sogar Brackwasserbedingungen (Lawrence 2007). Sie sind sogenannte Hartwasserfische, die mehr als 100 mg/l CaCO_3 tolerieren (Brand, Granato u.a. 2002). Aufgrund der geringen Körpergröße, der Robustheit, der günstigen Haltungsbedingungen, einer hohen Anpassungsfähigkeit, einem entschlüsselten Genom und der Existenz zahlreicher transgener Modelle sind ZF populäre Modellorganismen in vielen verschiedenen Forschungsbereichen geworden. In der Umwelttoxikologie sind vor allem ihre kurze Generationszeit, die hohe Fekundität, die kurzen Reproduktionszyklen sowie die transparenten Embryos für embryotoxikologische Bewertungen wichtig.

1.6 Ziel der Arbeit

Die Versalzung von Süßwasserflüssen ist ein weltweit wachsendes Umweltproblem. Es gibt eine ständig steigende Anzahl von Studien zu Effekten erhöhter NaCl-Konzentrationen auf Süßwasserorganismen. In Deutschland verursacht die direkte und indirekte Einleitung von Abwässern der Kalisalzproduktion erhöhte Salzeinträge in das Werra-Weser-Flusssystem. Neben dem Eintrag von Natriumchlorid verursachen verstärkt Ca^{2+} - und Kaliumeinträge Ionenimbalancen und unphysiologische Ionenverhältnisse ($\text{Na}^+:\text{K}^+$, $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$).

Ziel der Arbeit war die wissenschaftliche Untersuchung der Gefahren, die speziell für Jungfische und für die Reproduktion von Fischen von den Einleitungen der Kaliindustrie

ausgehen, und welche Ionen oder Ionenverhältnisse dafür ursächlich sind. Als Standard-Modellfischart wurden adulte ZF in Reproduktionstests sechs Wochen exponiert. Embryonen dieser Tiere wurden in Embryo-Larval-Tests (ELT) neun Tage exponiert. Des Weiteren wurden Embryonen von nicht exponierten Elterntieren in einem Early Life Stage Test (ELST) 21 Tage exponiert. In der Studie wurden neben reproduktionsbiologischen Endpunkten auch entwicklungsbiologische, histopathologische und molekularbiologische Endpunkte untersucht. Es wurden folgende Arbeitshypothesen aufgestellt:

Die Exposition mit erhöhten Konzentrationen von Cl^- , Mg^{2+} und K^+ führen zu:

1. Reproduktionsbiologischen Effekten:

- niedrigere Laichfrequenz und/oder verringerte Anzahl der Eier pro Laichereignis
- kleinere Ei- bzw. Dottergrößen als Spiegel des verringerten Energievorrats, welcher durch den elterlichen Organismus an die Nachkommen weiterinvestiert werden kann
- verringerte Eiqualität, welche in verringerten Befruchtungs- sowie erhöhten Deformations- und Koagulationsraten der Fischeier sichtbar wird
- morphologische Veränderungen in den Gonaden, welche in der Gonadenhistologie und den gonadosomatischen Indizes sichtbar werden
- Veränderungen der Genexpression der Gonadotropine Luteinisierendes Hormons (LH) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH) als Hauptregulatoren der Gonadenentwicklung

2. Direkten Effekten durch Anpassung an hyperosmotischen Stress:

- Histopathologische Veränderungen in den Kiemen, dem Hauptorgan der Osmoregulation
- Erhöhung des Ganzkörpercortisolgehaltes als Antwort auf osmoregulatorischen Stress

Einleitung

- Veränderungen der Genexpression der Mineralcorticoide Prolaktin (PRL) und Wachstumshormon (engl. growth hormon = GH) als Steuerhormone der Salinitätsakklimatisierung der ZF durch Regulierung der Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung von Chloridzellen

3. Entwicklungsbiologischen Effekten:

- Störungen des Mineraliengehaltes und der Mineraliengleichgewichte der juvenilen ZF, assoziiert mit Wachstumsstörungen
- Veränderungen der Herzschlagraten durch unphysiologische Verhältnisse von Na^+ und K^+
- Erhöhung der Deformations- und Mortalitätsraten und Verminderung der Schlupfraten der Embryonen und Larven

2. Material und Methoden

2.1 Ionenzusammensetzung und Ionenkonzentrationen

2.1.1 Einleitung der Abwässer aus der Kalisalzproduktion in die Werra

Die Einleitung der Kalilauge findet hauptsächlich durch die direkte Einleitung des Abwassers in den Gewässerkörper an den verschiedenen Standorten der Kaliwerke statt. Durch die Verpressung der Kalilauge in tiefere Gesteinsschichten entsteht außerdem salzbelastetes Grundwasser, welches an verschiedenen Stellen zu Tage tritt und im Gewässer zu diffusen Salzeinträgen führt. Zuflüsse unbelasteter Seitenarme führen wiederum zu Verdünnungseffekten. Dadurch entstehen entlang des Flusslaufes starke örtliche Schwankungen der Ionenkonzentrationen. Aus diesem Grund orientierte sich die Ionenzusammensetzung in den Testmedien an der Ionenzusammensetzung am Ort der Hauptbelastung, in Gerstungen. Auch die bestehenden gesetzlichen Grenzwerte für Mg^{2+} , K^+ und Cl^- richten sich nach den am Messpegel Gerstungen gemessenen Ionenkonzentrationen.

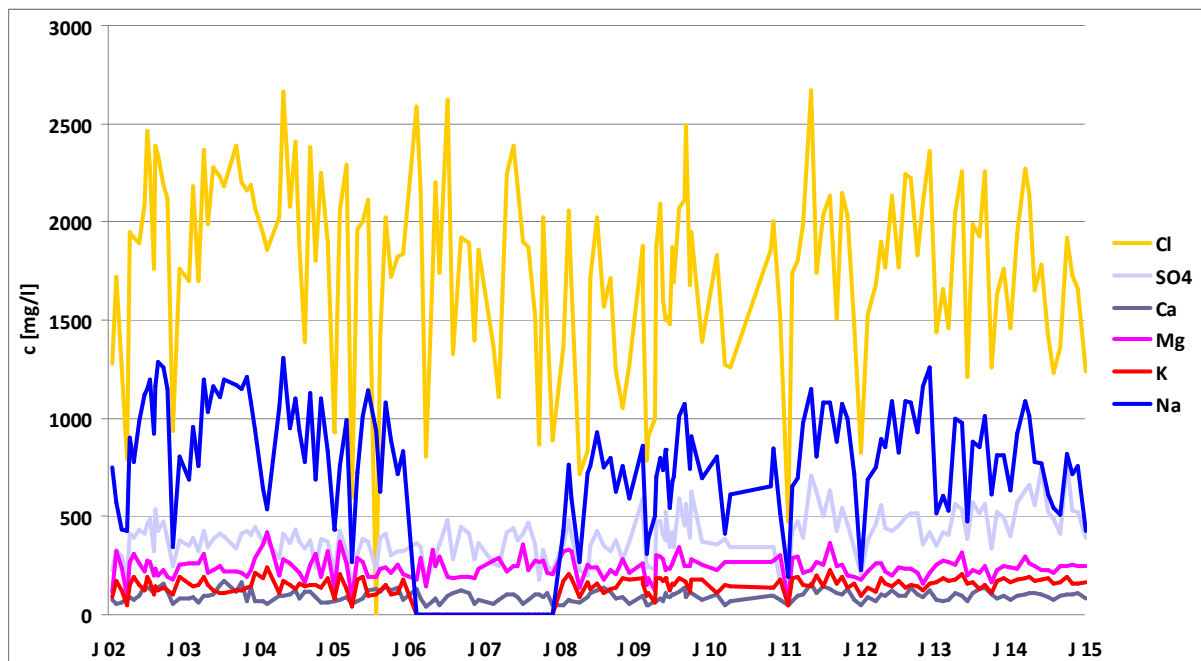


Abbildung 1: Ionenkonzentrationen der Werra am Messpegel Gerstungen (2002 - 2015) auf Grundlage von Messdaten der Thüringer Landesanstalt für Umwelt und Geologie (TLUG), Jena.

Die Menge der eingeleiteten Kalilauge wird durch die Kaliwerke den saisonal schwankenden Pegelständen angepasst, damit die Grenzwerte nicht überschritten werden. Dennoch entstehen

neben den örtlichen auch starke zeitliche Schwankungen der Ionenkonzentrationen (siehe Abbildung 1). Trotz der Variabilität der Ionenkonzentrationen sind die Verhältnisse der einzelnen Ionenspezies zueinander relativ gleich (siehe Tabelle 1).

2.1.2 Testmedien

Tabelle 1: Ionenverhältnisse; Gesamthärte und Leitfähigkeit am Messpegel Gerstungen auf Grundlage von Messdaten der TLUG

Statistik	Ionenverhältnisse					Gesamthärte	Leitfähigkeit
	K ⁺ :Na ⁺	Ca ²⁺ :Mg ²⁺	Ca ²⁺ :K ⁺	SO ₄ ²⁻ :Cl ⁻	K ⁺ :Mg ²⁺	[°dH]	[µS/cm]
Mittelwert	0,21	0,42	0,42	0,24	0,63	69	6.307
Standardabweichung	0,08	0,15	0,15	0,06	0,09	12	1.286
Variationskoeffizient	0,40	0,37	0,37	0,25	0,14	0,18	0,20

Die Ionenzusammensetzung der Testwässer beschränkt sich auf die Hauptgewässerionen Cl⁻, SO₄²⁻, Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ und K⁺. Die Höhe der Cl⁻, Mg²⁺ und K⁺ orientierte sich an den Grenzwerten, die vom Jahr 2012 bis zum Jahr 2020 abgesenkt werden sollen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Vorgesehene Reduzierung der Grenzwerte für die Konzentrationen von Cl⁻, Mg²⁺ und K⁺ bis 2020

Ionen	Grenzwerte	
	ab 1.12.2012	ab 1.12.2019
Cl ⁻ [mg/l]	<u>2.500</u>	<u>1.700</u>
Mg ²⁺ [mg/l]	<u>340</u>	<u>230</u>
K ⁺ [mg/l]	<u>200</u>	<u>150</u>

Es wurden insgesamt fünf Testmedien mit verschiedener Ionenzusammensetzung (Hoher Grenzwert, Niedriger Grenzwert, MgK, Mg, K) und eine Kontrolle konstituiert (Tabelle 5).

Hoher Grenzwert (HG) und Niedriger Grenzwert (GW):

Die Höhe der Ionenkonzentrationen in den Testmedien orientierte sich für Cl⁻, Mg²⁺ und K⁺ an den jeweils höchsten und niedrigsten Grenzwerten für 2012 und 2020. Die Höhe der Ca²⁺-Konzentration orientierte sich mit einem Verhältnis von 0,42 (Ca²⁺:Mg²⁺) an der Mg²⁺-Konzentration am Messpegel Gerstungen. Die Ionenbilanz wurde dann jeweils mit Natrium- und Sulfationen ausgeglichen. Von den natürlich vorkommenden Gewässerionen weisen diese Ionenspezies die geringste Toxizität für Süßwasserorganismen auf. Aus diesem Grund wurden sie als Ausgleichsionen gewählt. Die relative Toxizitätskaskade der Hauptsalzionen für

limnische Organismen stellt sich wie folgt dar: $K^+ > HCO_3^{2-} \approx Mg^{2+} > Cl^- > SO_4^{2-}$ (Goodfellow, Ausley u.a. 2000, Mount, Gulley u.a. 1997).

Kontrolle (Ktr):

Als Kontrolle diente für Toxizitätstests vorgeschriebenes Wasser nach DIN EN ISO 7346-1 und DIN EN ISO 7346-2. In der Durchflussanlage wurde Leitungswasser (Mittelwerte in mg/l: 76,47 Ca^{2+} , 4,55 K^+ , 8,75 Mg^{2+} , 92,00 Na^+ , 57,685 Cl^- , 157,71 SO_4^{2+}) verwendet.

Ktr + Kaliumsulfat (K), Ktr + Magnesiumsulfat (Mg) und Ktr + Magnesium- und Kaliumsulfat (KMg):

Auf der Basis der Ktr wurden drei weitere Testmedien erstellt, auf deren Grundlage die Effekte von erhöhten Einzelionenkonzentrationen und Ionenkombinationen untersucht werden konnten. Die Sulfate der Alkali- und Erdalkaliionen weisen eine deutlich geringere Toxizität auf als ihre Chloridsalze (Mount, Gulley u.a. 1997). Dementsprechend wurden die Sulfatsalze von Mg und K zugesetzt, damit die Effekte der Kationen weitestgehend unbeeinflusst von der Toxizität der Anionen untersucht werden konnten. Entsprechend der zugesetzten Salze ergaben sich die Testmedien: K (Ktr + Kaliumsulfat), Mg (Ktr + Magnesiumsulfat) und MgK (Ktr + Magnesium- und Kaliumsulfat). Für das Aufsalzen der Testmedien wurden folgende Salze verwendet: $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, KCl, NaCl, Na_2SO_4 , K_2SO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Für den Early Life Stage Test (ELST) und die Embryo-Larval-Tests (ELT) wurden Salze in Laborqualität (Carl Roth GmbH & Co. KG) verwendet. Der Reproduktionstest (RT) wurde in einer Durchflussanlage durchgeführt. Wegen der viel größeren benötigten Salzmenge; wurden für diesen Test Salze in Lebensmittelqualität (S3 Handel und Dienstleistungen UG) verwendet.

2.2 Fische und ihre Lebensstadien

Die Versuchstiere stammten aus der am IGB etablierten Zebrafischzucht. Um die besonders sensiblen Stadien im gesamten Lebenszyklus der Fische näher zu untersuchen, wurden mehrere Tests durchgeführt:

1. Die Embryonalentwicklung von der Befruchtung bis zum Schlupf
2. Die Larvalentwicklung bis zum juvenilen Tier mit der Umstellung von der endogenen zur exogenen Ernährung und der Umstellung von passiver zu aktiver Osmoregulation

3. Die Reproduktionsleistung der Elterngeneration
4. Die Embryonal- und Larvalentwicklung der F1-Generation

In der Summe ergeben diese Tests einen Partiellen Lebenszyklustest (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht der durchgeführten Tests (Art der Tests, Entwicklungsstadien der Versuchstiere, Testdauer und toxikologische Endpunkte)

	Embryonen	→	Larven	→	Adulte	→	F1- Generation
	↓		↓		↓		↓
Entwicklungs- stadium	Embryonal- entwicklung	→	Larval- entwicklung	→	Reproduktion	→	Embryonal- entwicklung/ Larval- entwicklung
Zeit	96 Stunden		21 Tage		6 Wochen		9 Tage
Test	Early Life Stage Test		Embryo-Larval- Test		Reproduktions- test		Early Life Stage Test
Endpunkte	<ul style="list-style-type: none"> • Mortalität • Schlupf • Deformationen • Herzfrequenzen 		<ul style="list-style-type: none"> • Mortalität • Schlupf • Deformationen • Mineralgehalt • endogene → exogene Ernährung • Wachstum • passive → aktive Osmoregulation 		<ul style="list-style-type: none"> • Mortalität • Kiemen • Gonaden • Hypophysen- hormone • Cortisol • Entwicklung • Wachstum • Legeverhalten (Quantität) • Ei- Eigenschaften (Qualität) 		<ul style="list-style-type: none"> • Mortalität • Schlupf • Deformationen

2.3 Indizes

2.3.1 Gonadosomatischer Index (GSI)

Für den GSI wurden die Gesamtkörpermasse (W) des abgetupften Fisches und die Masse seiner Gonaden (G) nach dem Präparieren mit einer Feinwaage (Sartorius Competence) bestimmt. Als Anteil der Gonaden am Gesamtkörpergewicht wird der GSI wie folgt berechnet:

$$\text{GSI} = \frac{G \text{ (g)}}{W \text{ (g)}} \times 100 \%$$

2.3.2 Relativer Konditionsfaktor (RKF)

Der relative Konditionsfaktor wird nach der folgenden Formel aus Gesamtkörpermasse (W) in g und der Gesamtkörperlänge (L) in mm berechnet.

$$x = \frac{W}{(a \times L^b)}$$

Die Parameter a und b wurden von den Tieren der Ktr nach der untenstehenden Formel bestimmt (Smolders, Bervoets u.a. 2002). Die Variablen a und b sind Anstieg und Konstante der Regressionsgeraden. Der RKF der Tiere in der Ktr beträgt immer eins und die RKF der Expositionsgruppen beziehen sich auf diesen.

$$\log W = \log a + b \log L$$

2.4 Reproduktionstest

Der Reproduktionstest (RT) wurde nach den OECD Standards für das Fish Reproductive Screening Assay (OECD. TG 229) konzipiert. Für den Test wurden je Expositionsgruppe 20 Tiere – insgesamt 120 Tiere – exponiert. Als Versuchstiere wurden unter gleichen Bedingungen aufgezogene, adulte, laichreife Zebrafische gleichen Alters (86 Tage) verwendet. Vor dem Versuch wurden die Tiere gemessen und gewogen (Tabelle 4). Jeweils zwei Milchner und zwei Rogner wurden in eine Laichbox (Länge x Breite x Höhe: 24,5 x 15 x 16,5 cm, AQUA Schwarz GmbH) gesetzt.

Tabelle 4: Länge und Masse der Versuchstiere (Mittelwert ± Standardabweichung)

	Mittlere Masse [mg]	Mittlere Länge [mm]
Milchner	769,2 ± 67,5	40,2 ± 1,9
Rogner	478,6 ± 36,2	37,0 ± 1,3

Zur Strukturierung der Laichboxen und als Laichsubstrat wurde in die Laichbox Javamoos (*Taxiphyllum barbieri*) gegeben. Der Gesundheitsstatus der Tiere wurde täglich visuell kontrolliert und protokolliert. Die Zebrafische (ZF) wurden fünfmal täglich mit lebenden *Artemia salina*-Nauplien und kommerziellem Flockenfutter (TetraMin, Tetra GmbH) gefüttert. Der Versuch fand in einer Durchflussanlage mit einem fünffachen Wasservolumen-austausch pro Tag und Aquarium statt. In der Ktr wurde gefiltertes Leitungswasser genutzt. In

den Expositionen wurden die Salzkonzentrationen der Testwässer über eine dosierte Beimischung von Salzlösungen eingestellt (Abbildung 2). Die Durchflussanlage besteht aus einer Wasseraufbereitungseinheit und einem Wasserbad, in dem die Laichboxen temperiert wurden. Das Expositionsmedium wurde den Laichboxen (5 Replikate pro Exposition) über eine gemeinsame Mischkammer zugeleitet. In die Mischkammer flossen gefiltertes Leitungswasser (Lutz, Kloas u.a. 2008) und die Stammlösung, die über eine Peristaltikpumpe dosiert wurde. Der Leitungswasserzufluss in die Mischkammern wurde durch einen Rotameter reguliert. Das aus beiden Zuflüssen (Stammlösung und gefiltertes Leitungswasser) resultierende Expositionsmedium floss direkt in die fünf Laichboxen der jeweiligen Exposition. Die Stammlösungen wurden alle vier Tage erneuert und in lichtgeschützten Glasflaschen gelagert.

Die Ionenkonzentrationen wurden wöchentlich gemessen und es wurde sichergestellt, dass die Zielkonzentrationen mit weniger als 20 % Abweichungen eingehalten werden konnten (Tabelle 5). Die Konzentrationen der Kationen (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) wurden mittels Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie (PinAAcle™ 900T), die Anionen (Cl^- , SO_4^{2-}) mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (Dionex ICS-2000, Säule: Dionex IonPac™ AS10) bestimmt.

Tabelle 5: Mittelwerte \pm Standardabweichung und Variationskoeffizienten für die Ionenkonzentrationen in den Testwässern

	Cl^- [mg/l]			Mg^{2+} [mg/l]			K^+ [mg/l]		
Ktr	56,9 \pm	3,1	5,5 %	8,8 \pm	0,3	3,0 %	4,5 \pm	0,2	5,1 %
HG	2541,6 \pm	384,5	15,1 %	340,6 \pm	25,0	7,3 %	207,6 \pm	30,1	14,5 %
HG	1597,6 \pm	184,8	11,6 %	234,6 \pm	21,2	9,0 %	145,6 \pm	11,5	7,9 %
MgK	50,6 \pm	4,8	9,5 %	350,5 \pm	22,1	6,3 %	181,1 \pm	15,3	8,4 %
Mg	51,2 \pm	3,0	5,9 %	331,5 \pm	50,3	15,2 %	13,0 \pm	0,6	4,6 %
K	59,4 \pm	1,5	2,5 %	11,3 \pm	0,7	6,0 %	197,8 \pm	13,9	7,0 %

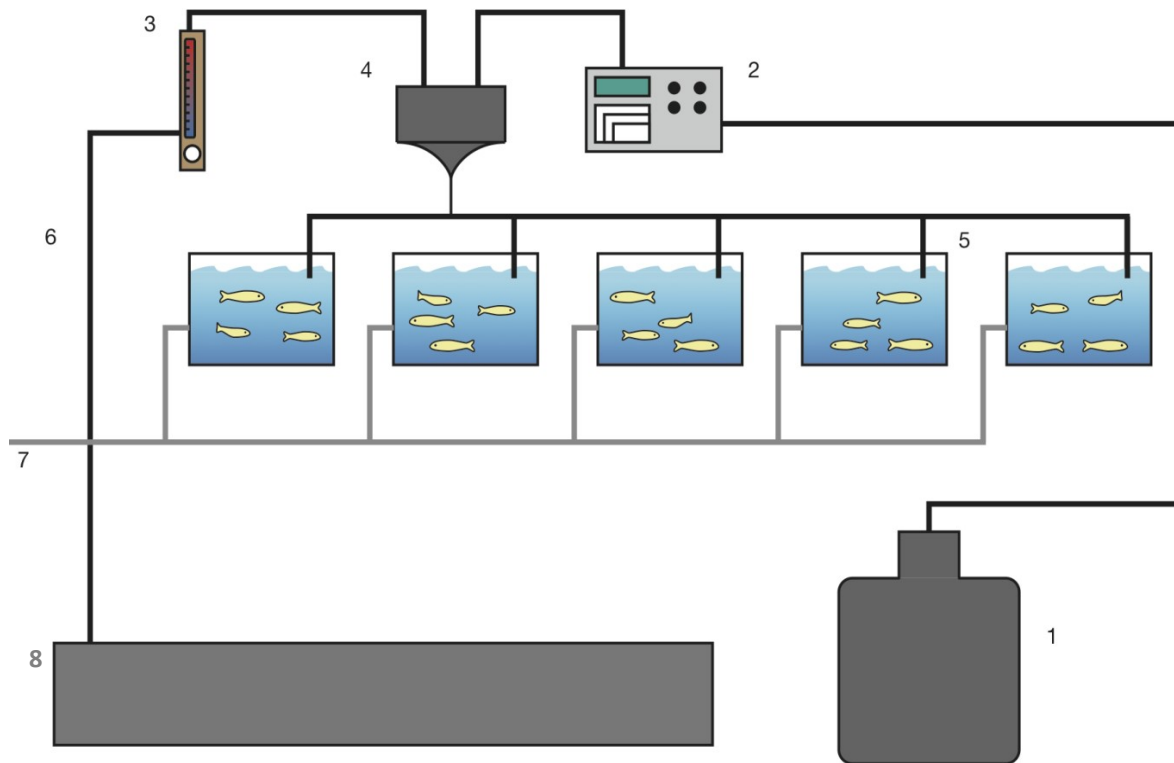


Abbildung 2: Schematische Skizze vom Versuchsaufbau: 1 = Stammlösung, 2 = Pumpe, 3 = Rotameter, 4 = Mischkammer, 5 = Laichbox, 6 = Leitungswasserzufluss, 7 = Abfluss, 8 = Zufluss

Die chemisch-physikalischen Wasserparameter wie Sauerstoffgehalt, Temperatur, pH-Wert und Leitfähigkeit sowie die Beleuchtungsstärke wurden wöchentlich gemessen und protokolliert (Tabelle 6).

Tabelle 6: Physikalisch-chemische Wasserparameter (Mittelwert \pm Standardabweichung)

	O ₂ [g/l]	Temp [°C]	pH-Wert	Leitfähigkeit [ms/cm]	Beleuchtungsstärke [lux]
HG	7,55 \pm 0,38	25,84 \pm 0,25	7,86 \pm 0,08	7,98 \pm 0,54	498 \pm 120
NG	7,71 \pm 0,29	25,68 \pm 0,21	7,81 \pm 0,11	5,29 \pm 0,46	562 \pm 69
Ktr	7,54 \pm 0,29	25,61 \pm 0,22	8,03 \pm 0,09	0,84 \pm 0,01	479 \pm 126
K	7,30 \pm 0,34	26,09 \pm 0,32	7,93 \pm 0,18	1,38 \pm 0,05	576 \pm 78
Mg	7,51 \pm 0,25	26,21 \pm 0,38	7,99 \pm 0,07	2,5 \pm 0,38	511 \pm 132
MgK	7,52 \pm 0,43	25,67 \pm 0,27	8,02 \pm 0,11	3,1 \pm 0,2	589 \pm 33
Gesamt	7,52 \pm 0,35	25,85 \pm 0,36	7,94 \pm 0,14		536 \pm 107

Die Höhe der organischen Belastung wurde wöchentlich kontrolliert (Tabelle 7). Dafür wurden Nitritstickstoffkonzentration (NO₃-N) und Ammoniumstickstoffkonzentration (NH₄-N) photometrisch bestimmt (HACH Lange Photometer DR 3900).

Tabelle 7: Nitrit-N und Ammonium-N (Mittelwert \pm Standardabweichung)

	pH-Wert	NO ₂ ⁻ -N [mg/l]	NH ₄ ⁺ -N [mg/l]
Ktr	8,15 \pm 0,14	0,080 \pm 0,137	0,088 \pm 0,128
HG	8,08 \pm 0,31	0,081 \pm 0,155	0,101 \pm 0,137
NG	8,14 \pm 0,18	0,068 \pm 0,109	0,093 \pm 0,127
Mg	8,11 \pm 0,17	0,059 \pm 0,098	0,098 \pm 0,137
MgK	8,11 \pm 0,16	0,071 \pm 0,106	0,090 \pm 0,130
K	8,13 \pm 0,18	0,065 \pm 0,106	0,123 \pm 0,202

Vor der Exposition, die über einen Zeitraum von sechs Wochen stattfand, wurden die Tiere vier Wochen an die Konditionen in der Anlage adaptiert. Während dieser Zeit fand keine Salzexposition statt und es wurde täglich kontrolliert, ob ein Laichereignis stattfand. Eine ausreichende Laichfrequenz, Laichmenge und Befruchtungsrate konnte dadurch für alle Laichgruppen (zwei Milchner, zwei Rogner) sichergestellt werden.

Am Ende der Exposition wurden die Tiere mit Eiswasser bis zum Stillstand der Opercularbewegungen und der Herzschläge euthanasiert (Matthews und Varga 2012). Danach wurde der Kopf der Tiere abgetrennt, aus welchem die Hypophyse und der mediale zweite Kiemenbogen der linken Körperhälfte freipräpariert wurden. Der Bauchhöhle wurden die Gonaden für die Histologie entnommen. Jeweils sechs Tiere pro Expositionsgruppe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.4.1 Elterngeneration

2.4.1.1 Histologie

Von den Parentaltieren wurde jeweils ein Kiemenbogen der linken Körperhälfte sowie die paarigen Gonaden entnommen und in Bouin'scher Lösung 24 h fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Proben in 70 % Ethanol (EtOH) überführt. Dieser Schritt wurde nach jeweils 24 h zweimal wiederholt und die Proben anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Vor der Einbettung in Paraffinblöcke wurden die Proben im Automaten schrittweise entwässert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Entwässerungsprotokoll

	Chemikalie	Temperatur	Verweildauer
1.	75 % EtOH	Raumtemperatur	1 h
2.	90 % EtOH	Raumtemperatur	1 h
3.	95 % EtOH	Raumtemperatur	1 h
4.	100 % EtOH	Raumtemperatur	1 h
5.	100 % EtOH	Raumtemperatur	1 h
6.	100 % EtOH	Raumtemperatur	1 h
7.	Xylol	Raumtemperatur	1 h
8.	Xylol	Raumtemperatur	1 h
9.	Xylol	Raumtemperatur	1 h
10.	Paraffin	60°C	1h 20min
11.	Paraffin	60°C	1h 20min
12.	Paraffin	60°C	1h 20min

Nach dem Entwässern wurden die Proben manuell in Paraffin eingebettet. Die Kiemenbögen wurden sorgfältig positioniert, damit die Blöcke entlang der Primärfilamente geschnitten werden konnten. Die paarigen Gonaden wurden parallel zueinander ausgerichtet.

Das Schneiden der eingebetteten Proben wurde mit einem Rotationsmikrotom durchgeführt. Die Schnittdicke betrug bei den Kiemenbögen 3 µm, bei den Ovarien 5 µm und bei den Testes 3,5 µm. Die Serienschnitte wurden zum Glätten auf die Wasseroberfläche in einem erwärmten Wasserbad (Aqua dest.) gegeben (45°C). Danach wurden sie auf einen Objektträger aufgezogen und auf einer Heizplatte getrocknet (45°C).

Vor dem Färben wurden die Proben bei 60 °C im Trockenschrank über Nacht getrocknet. Die Proben wurden mit Xylol in einer Verdünnungsreihe entparaffiniert und danach mit Ethanol in einer Verdünnungsreihe rehydratisiert. Anschließend wurden die Proben mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) gefärbt. Vor der Konservierung wurden die Proben kurz getrocknet und dann mit Roti-Histokitt II eingedeckelt. Die einzelnen Schritte des Färbeprotokolls sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Färbeprotokoll

Chemikalie	Dauer [min]
Xylol	5
Xylol	5
100 % EtOH	2
96 % EtOH	2
70 % EtOH	2
40 % EtOH	2
Aqua dest.	2
Hämatoxylin	2
Spülen mit fließendem Leitungswasser	10
Eosin	1
Aqua dest.	5 x Eintauchen
80 % EtOH	2
96 % EtOH	2
100 % EtOH	2
100 % EtOH	2
Xylol	5

2.4.1.2 Mikroskopische Auswertung Gonaden

Die histologischen Schnitte wurden lichtmikroskopisch (Olympus BX50 Mikroskop) fotografiert, archiviert und anschließend analysiert (Olympus XC50 Kamera). Die Auswertung und Vermessung der Gewebeschnitte wurde mittels Bildanalyse-Software AnalySIS 5.0 von Olympus durchgeführt.

2.4.1.2.1 Ovarien

Die histologischen Schnitte wurden nach einer modifizierten Version von Johnson, Wolf u.a. (2009) ausgewertet. Die Gonaden wurden geschnitten, bis ungefähr die Hälfte des Organs entfernt war. Dann wurden drei aufeinanderfolgende Schnitte (5 μm) pro Individuum durchgeführt. Zur Analyse von Größe und Zellanzahl der Oozyten wurde ein Feld von 2,25 mm^2 Fläche im Zentrum der Schnittfläche markiert und ausgewertet (Leino, Jensen u.a. 2005). Dafür wurden die Reifestadien der Oozyten in vier Hauptklassen unterteilt: perinukleolare Oozyten, kortikale/alveoläre Oozyten, frühvitellogene Oozyten und spätvitellogene Oozyten. Die Unterteilung fand anhand ihres morphologischen Erscheinungsbildes, dem Vorhandensein bzw. Fehlen von Dotter, ihrer Farbe und Größe statt (Johnson, Wolf u.a. 2009). Quantifiziert wurden die Zellen über die Zellanzahl der Reifestadien im Untersuchungsfeld und die Größe (Flächeninhalt) aller Zellen im gleichen Reifestadium im Untersuchungsfeld (Tabelle 10). Für

die Auswertung wurden die Mittelwerte der ermittelten Ergebnisse aus den drei Schnitten gebildet.

Tabelle 10: Beschreibung der analysierten Reifestadien

Reifestadium	Charakteristika	Größe
Perinukleolare Oozyten	Die Oozyten bilden Nester, die sich, wenn sie größer werden, in einem Follikel verteilen. Die pleiomorphen Nucleoli grenzen an die Kernhülle.	$< 0,1 \text{ mm}^2$
Kortikale/alveoläre Oozyten	Die Oozyten sind größenvariabel und durch eine Vitellinhülle mit kleinen Lipidtröpfchen charakterisiert.	$0,1 - 0,5 \text{ mm}^2$
Frühvitellogene Oozyten	Oozyten sind größenvariabel und die peripheren Nucleoli sind sichtbar. Die Dotterproteine werden sichtbar und die Dotterkörperchen mit kristallinem Dotter wachsen an.	$0,4 - 0,9 \text{ mm}^2$
Spätvitellogene Oozyten	In den reifen Oozyten lösen sich die Dotterkristalle auf. Das Keimbläschen verliert seine Nukleoli, wandert an die Peripherie und löst sich auf. Die Dotterkörperchen in der Mitte der Zellen werden größer und fusionieren.	$< 0,9 \text{ mm}^2$

Bei der Auswertung der Schnitte wurde einerseits die Fläche der Oozyten (mm^2) im jeweiligen Reifestadium, andererseits die Anzahl der Oozyten in den verschiedenen Reifestadien ermittelt. Aufgrund der unregelmäßigen Form der Gonadenzellen wurde die Oozytengröße durch Messung des Flächeninhaltes bestimmt (Bildanalyse-Software AnalySIS 5.0).

2.4.1.2.2 Testes

Im Gegensatz zu den Ovarien sind die Spermatozyten nicht gleichmäßig im Organgewebe verteilt. Deshalb wurden mehrere Bereiche der Gonaden analysiert (Leino, Jensen u.a. 2005). Zur Auswertung der männlichen Gonaden wurden in jeweils drei Bereichen (proximal, medial und distal) drei Felder (Größe: $0,2 \text{ mm}^2$) zufällig ausgewählt. Diese wurden mit 40-facher Vergrößerung ausgewertet. Dabei wurden die Spermatozyten in drei Hauptstadien aufgeteilt: Spermatiden, Spermatozyten und Spermatogonien (Tabelle 11). Die Reifestadien unterschieden sich aufgrund ihrer Farbe, Größe und Transparenz. Die Zellen eines Reifestadiums treten gehäuft in Konglomeraten auf. Mit der Größe der Konglomerate eines Zelltyps wurde auf das Vorkommen der Reifestadien in der Gonade geschlossen.

Tabelle 11: Beschreibung der analysierten Reifestadien

Reifestadium	Charakteristika	Größe
Spermatogonien	Spermatogonien sind die größten spermatogenen Zellen. Sie sind zahlreich an den Rändern der <i>Tubuli seminiferi</i> verteilt. Sie haben blasse vesikuläre Nuclei und granuläres Zytoplasma. Mit Beginn der Meiose entwickeln sie sich zu Spermatozyten.	5 - 10 µm
Spermatozyten	Sie entwickeln sich aus den Spermatogonien und können in zwei Subtypen unterteilt werden: primäre Spermatozyten und sekundäre Spermatozyten. Letztere sind kleiner und besitzen mehr basophilen Nuclei als die primären Spermatozyten.	4 - 6 µm
Spermatiden	Spermatiden sind die kleinsten Zellen im Keimepithel mit kleinen dichten basophilen Nucleoli. Sie entwickeln sich aus den Spermatozyten während der zweiten meiotischen Teilung.	2 - 3 µm

2.4.1.3 Mikroskopische Auswertung der Kiemen

Alle histologischen Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung ausgewertet. Für die Auswertung der Schnitte wurde die Beschriftung der Objektträger maskiert. Bei jeder Kieme wurden drei Primärfilamente und von diesen wiederum zehn Sekundärfilamente auf dorsaler und ventraler Seite analysiert. Die Primärfilamente wurden aus einer inneren Sektion der Kieme ausgewählt, um eine Beeinflussung durch physikalisch/-mechanische Beanspruchung weitestgehend auszuschließen. Insgesamt wurden 60 Filamente pro Individuum analysiert. Die morphologischen Veränderungen der Kiemen wurden in vier verschiedene Kategorien eingeteilt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Übersicht und Beschreibung der analysierten Veränderungen

Kategorien	Charakteristika	Schweregrade
Hyperplasien	Proliferation von Zellen des Kiemenepithels	leicht, mittel, schwer
Fusionen	Zusammenwachsen von Kiemenfilamenten	leicht, mittel, schwer
Epithelabhebungen	Abhebung, Ruptur und Ödeme von Epithelzellen	leicht, mittel, schwer
Aneurismen	Einblutungen des Epithels der Sekundärfilamente	keine

Die Symptome Hyperplasie, Fusion und Epithelabhebung wurden des Weiteren in Schweregrade (leicht, mittel, schwer) unterteilt. Diese spiegeln die Anzahl der betroffenen Zellen bzw. Zellschichten wider. Waren eine bis zwei Zellschichten betroffen, handelte es sich um eine schwache, bei drei bis fünf Zellschichten um eine mittlere und bei mehr als fünf Zellschichten um eine schwere Deformation.

2.4.1.4 Ganzkörpercortisol

2.4.1.4.1 Cortisolextraktion

Die Cortisolextraktion fand nach dem Protokoll von Canavello (Canavello, Cachat u.a. 2011) statt. Die Versuchstiere wurden in Eiswasser sediert und getötet. Durch die Siebeinsätze der Abblanchboxen war ein gleichzeitiges und sofortiges Eintauchen der Tiere in das Eiswasser gewährleistet. Die Gefahr einer Erhöhung der Cortisolwerte durch Stress beim Fangen der Tiere konnte dadurch minimiert werden. Nach dem Wiegen und Messen der Tiere wurden sie in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Proben wurden aufgetaut und in Rollrandgläschen mit einer Sezierschere zerkleinert und homogenisiert. Die Rückstände wurden mit 2x500 µl PBS Puffer von der Schere abgewaschen und der Probe zugeführt. Das Besteck wurde zwischen jedem Homogenisieren einer Probe mehrfach mit Ethanol (70 %) und destilliertem Wasser gespült.

Den Proben wurden 3 ml Diethylether zugefügt und sie wurden für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Für die bessere Phasenseparation wurden die Proben 30 min bei -80 °C eingefroren und der flüssige Überstand (Etherphase) in separate Rollrandgläschen überführt und mit Stickstoff abgedampft. Diese Schritte wurden dreimal wiederholt, um die Effektivität der Cortisolextraktion zu maximieren. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Vor dem ELISA Assay wurden die eingefrorenen Cortisolextrakte aufgetaut und mit 500 µl PBS Puffer rückgelöst.

2.4.1.4.2 Cortisol ELISA Essay (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Zur Bestimmung des Cortisolgehaltes der Extraktionsproben wurde das Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Cortisol aus menschlichem Speichel der Firma IBL International GmbH verwendet (RE52611).

Vor dem ELISA Essay wurden die eingefrorenen Cortisolextrakte aufgetaut und mit 500 µl PBS-Puffer rückgelöst.

Protokoll ELISA

1. Je 50 µl der Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Wells einer Mikrotiterplatte pipettieren
2. Je 100 µl Enzymkonjugat in jedes Well pipettieren, die Platte mit Haftklebefolie abdecken und vorsichtig schütteln
3. Platten für 2 h bei RT (18-25°C) auf einem Orbitalschüttler (500 U/min) inkubieren

4. Folie entfernen und die Inkubationslösung verwerfen, Platte viermal mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen und restliche Flüssigkeit auf Papiertüchern ausklopfen
5. Je 100 µl TMB Substratlösung in jedes Well pipettieren
6. 30 min bei RT (18-25°C) auf einem Orbitalschüttler (500 U/min) inkubieren
7. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µl TMB Stopplösung in jedes Well anhalten und die Platte kurz schütteln bis ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet
8. Messen der optischen Dichte mit einem Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 600-650 nm)

Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte mit dem Plattenreader (Tecan infinite M200).

Die Konzentrationen wurden anschließend mit der Cubic-spline-Methode berechnet.

2.4.1.5 Genexpressionsanalysen der Hypophysenhormone – Luteinisierendes Hormon (LH), Follikelstimulierendes Hormon (FSH), Prolaktin (PRO) und Wachstumshormon (GH)

Für die Bestimmung der Expressionslevel der Hypophysenhormone wurde die sogenannte Quantitative Echtzeit-PCR oder engl. real-time quantitative PCR verwendet. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Verbindung mit dem Einbau von einem DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff in die entstehenden PCR-Produkte. Mit Hilfe der Fluoreszenzsignale kann die Vervielfältigung des PCR-Produkts in Echtzeit gemessen werden, da die Intensität der Fluoreszenzsignale proportional zur Akkumulation des PCR-Produkts zunimmt. Die Quantifizierung der Nukleinsäuren findet nur in der exponentiellen Phase der PCR statt.

2.4.1.5.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus den Hypophysen

Die Hypophysen wurden nach der Entnahme aus den Versuchstieren in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Extraktion der RNA aus den Hypophysen erfolgte nach dem Protokoll des RNeasy Plus Micro Kits der Firma Qiagen.

Protokoll der RNA-Extraktion

1. Gewebe mit einem Tissue Lyser (Qiagen/Retsch) bei 18 rpm für 2 x 2 min unter Zugabe von 350 µl RLT-Puffer (Lysis-Puffer) homogenisieren.
2. Proben 3 min bei Raumtemperatur bei 12000 U/min (Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau) zentrifugieren und den Überstand in eine gDNA Eliminator-Säule überführen.
3. Danach Proben für 15 sec bei 10.000 U/min zentrifugieren und den Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen, welches vorher mit 350 µl 70 % EtOH p. a. gefüllt wurde.
4. Nach dem Mischen der Proben 700 µl der Suspension auf eine RNeasy MiniElute-Säule überführen.
5. Zentrifugieren der Proben für 15 sec (10.000 U/min), anschließend das Eluat verwerfen.
6. 700 µl RW1-Puffer (Wasch-Puffer) auf die Säule geben.

7. Zentrifugieren für 15 sec bei 10.000 U/min und Verwerfen des Eluats.
8. 500 µl RW1-Puffer (Wasch-Puffer) auf die Säule geben.
9. Zentrifugieren für 15 sec bei 10.000 U/min und Verwerfen des Eluats.
10. 500 µl RPE-Puffer (Wasch-Puffer) auf die Säule geben.
11. Zentrifugieren für 15 sec bei 10.000 U/min.
12. 500 µl EtOH 80 % auf die Säule geben.
13. Zentrifugieren für 2 min bei 10.000 U/min und Verwerfen des Eluats.
14. Vollständige Entfernung des Alkohols durch Zentrifugation für 5 min bei 12000 U/min, bei geöffnetem Säulendeckel
15. Überführen der Säulen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß
16. Zugabe von 14 µl RNase-freiem Wasser zur Eluierung der RNA
17. Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur
18. Zentrifugieren für 1 min bei 12.000 U/min
19. Eluat nochmals über die Säule geben, 1 min inkubieren und 1 min bei 12.000 U/min zentrifugieren

2.4.1.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und RNA Integrity Number (RIN-Wert)

Die extrahierte RNA wurde für die korrekte Erfassung der Konzentration mit RiboGreen nach dem Protokoll der Firma Invitrogen gemessen. Gegenüber der spektrometrischen Messung von RNA können bei dieser Methode durch die spezifische Bindung der fluoreszierenden RiboGreen-Partikel sehr geringe RNA-Konzentrationen (bis zu 1 ng/µl) gemessen werden.

Das RiboGreen-Reagenz (Invitrogen) wurde zur Messung von RNA-Endkonzentrationen im Bereich von 1-50 ng/ml 1:2.000 mit 1x TE-Puffer verdünnt. Von der Standard-Nukleinsäure-Lösung bekannter Konzentration wurde eine Eichreihe mit fünf verschiedenen Konzentrationen im angegebenen Messbereich erstellt. Für die Messung wurden die Versuchsproben 1:100 mit 1x TE-Puffer verdünnt und in einer optischen 96-Well-Mikroplatte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) zusammen mit den Standardproben mit 100 µl der verdünnten RiboGreen-Lösung gemischt. Nach lichtgeschützter Inkubation für drei Minuten und bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Proben im Plattenreader (Tecan infinite M200, Agilent) bestimmt. Die RNA-Konzentrationen der Proben wurden mit Hilfe einer linearen Regression von der Eichgerade berechnet.

Für einen Teilsatz der Proben wurde die RNA Integrity Number (RIN) mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent) nach dem Protokoll der Firma Agilent bestimmt. Auf Basis der ribosomalen Untereinheiten 18S und 28S rRNA und deren Verhältnis zueinander wird von der Geräte-Software ein RIN-Wert zwischen 1 und 10 ermittelt, der die Qualität der RNA widerspiegelt. RIN-Werte zwischen 5 und 8 deuten auf sehr gering degradierte RNA hin und sind daher als gut, ohne große Beeinträchtigung in der relativen Quantifizierung, einzustufen. RIN-Werte

> 8 sind als sehr gut zu werten. Ein Wert von 10 deutet auf das geringste Niveau der Degradation der RNA hin. Alle ausgewerteten Proben wiesen ein RIN zwischen 7,1 und 9,1 auf.

2.4.1.5.3 Erststrangsynthese der cDNA durch reverse Transkription

Die mRNA jeder Probe wurde durch reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Das Enzym, welches diese Reaktion katalysiert, ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Reverse Transkriptase (RT). Durch den Einsatz eines poly-dT-Primers erfolgt die cDNA-Synthese ausschließlich aus mRNA, die sich durch eine Polyadenylierung am 3'-Ende von den restlichen RNA-Typen unterscheidet.

Alle Reagenzien für die Synthese wurden auf Eis vorbereitet. Die Synthese selbst fand in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) unter Verwendung zweier Reaktionsgemische (Premixe) statt.

Zusammensetzung Premix I (pro Probe)

1. 1 µl PCR-H₂O (RNase-freies Wasser, VWR)
2. 1,5 µl poly-dT-Primer 1:5 verdünnt (Sequenz: 5'CCTgAATTCTAgAgCTCA(T)17-3'; Biometria, Göttingen)

Zusammensetzung Premix II (pro Probe)

1. 2 µl 10* AffinityScript RT Puffer (Stratagene)
2. 2 µl DTT 100 mM (Stratagene)
3. 1 µl dNTP-Lösung (10 mM je dNTP, Biometra, Göttingen)
4. 1 µl Affinity Script Multiple Temperature Reverse Transcriptase (Stratagene)

Im ersten von zwei Schritten wurden pro Probe 10 µl verdünnte RNA mit einer Konzentration von 1,5 ng/µl in einem 200 µl Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) vorgelegt und mit 4 µl Premix I versetzt. Zur Anlagerung des poly-dT-Primers an die mRNA wurden die Proben für 5 min bei 65°C im Thermocycler inkubiert und im Anschluss innerhalb von 10 min langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Im zweiten Schritt, der eigentlichen cDNA-Erststrangsynthese, wurden zu jeder Probe 6 µl Premix II gegeben und diese für 60 min bei 42°C im Thermocycler inkubiert. Zur Inaktivierung der Transkriptase wurde 15 min bei 70°C inkubiert. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die 20 µl cDNA bei -20°C gelagert.

Als Ktr für die cDNA-Synthese dienten Kontroll-RT-PCR-Proben ohne Zusatz von RT-Enzym (-RT).

2.4.1.5.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die PCR-Bedingungen wurden für die verschiedenen untersuchten Gene in Vorversuchen optimiert. Die Effizienz aller untersuchten Primer wurde durch eine Verdünnungsreihe der cDNA mit sechs Verdünnungsstufen untersucht und erreichte bei allen Primern zwischen 87 % und 99 %. Die PCR-Produkte wurden durch SeqLab, Göttingen, sequenziert und mit Hilfe des Primer3-Programms und des BLAST-Programms auf NCBI analysiert. Alle vorbereitenden Arbeitsschritte der PCR erfolgten auf Eis. Die Amplifizierung selbst fand in einem Mx3005P qPCR-Cycler statt (Stratagene).

Die Sequenz für das Prolaktin-Primerpaar wurde mit Hilfe des Primer3-Programms entworfen.

Die cDNA wurde vor Durchführung der PCR im Verhältnis 1:1 (für die Bestimmung von Luteinisierendem Hormon (LH), Wachstumshormon (GH), Prolaktin (PRO) und dem Elongationsfaktor (EF) bzw. 1:20 (für die Bestimmung von Follikelstimulierendem Hormon (FSH)) mit RNase-freiem Wasser (VWR) verdünnt. Danach wurden je 2 µl der verdünnten cDNA-Probe in die 96-Well-PCR-Platte (Agilent) überführt und mit 18 µl PCR-Premix versetzt.

Premix für die Bestimmung der Gene:

1. 14,42 µl PCR-H₂O
2. 2,00 µl 10x Puffer für Taq DNA-Polymerase (ohne MgCl₂, Invitrogen)
3. 0,80 µl MgCl₂ (50 mM, Invitrogen)
4. 0,17 µl dNTP-Lösung (10 mM je dNTP, Biometra)
5. 0,11 µl Sybr – 200 (Invitrogen)
6. 0,15 µl Primer vorwärts (50 µM bzw. 25 µM, TipMol)
7. 0,15 µl Primer rückwärts (50 µM bzw. 25 µM, TipMol)
8. 0,2 µl Platinum Taq Polymerase (5 U/µL, Invitrogen)

Die Proben wurden im Thermocycler nach dem folgenden Protokoll prozessiert:

Protokoll der Prozessierung der Proben im Thermocycler

1. 7 min 40 sec bei 95°C zur Aktivierung der HotStart Taq Polymerase
2. 17 sec bei 95°C zur Auftrennung der cDNA in Einzelstränge
3. 25 sec bei Primer-abhängigen Temperaturen zur Anlagerung der Primer an die DNA

Material und Methoden

4. 25 sec bei 72°C Synthese des cDNA-Komplementärstrangs
5. 40 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
6. Datenauswertung im Schmelzkurventemperaturprogramm

Für jedes Gen wurde die Temperatur zur Anlagerung der genspezifischen Primer hinsichtlich der maximalen cDNA-Ausbeute in Vorversuchen optimiert. Eine Übersicht der verwendeten Bedingungen und Sequenzen der spezifischen Primer zeigt Tabelle 13. Für die PCR wurde die Platinum Taq Polymerase der Firma Invitrogen verwendet.

Tabelle 13: Übersicht der Primer-spezifischen PCR-Bedingungen

Zielgene	Primer	Sequenz (5' → 3')	T _A [°C]	Primer- konz. [nM]	MgCl ₂ Konz. [nM]	Produkt- größe [bp]
FSH*	sense	TGAGCGCAGAATCAGAATG	62	188	2	105
	antisense	AGGCTGTGGTGTCTGATTGT				
LH**	sense	GCAGAGACACTTACAACAGCC	64	375	2	145
	antisense	AAAACCAAGCTCTGAGCAGCC				
GH**	sense	CGAGACGCCGACGGGAAAAG	64	375	2	271
	antisense	CGGCAGGGAGTCGTTGTCATC				
PRO***	sense	CAACCTGTCCACTCTCCCGT	64	188	2	210
	antisense	GCATTACACCGAGAGCAGC				
EF**	sense	GGCTGACTGTGCTGTGCTGATTG	59	375	2	409
	antisense	CTTGTCGGTGGGACGGCTAGG				

T_A – Annealing-Temperatur, EF – Elongationsfaktor, FSH – Follikelstimulierendes Hormon, β-LH – Luteinisierendes Hormon, β-Untereinheit, GH – Wachstumshormon, PRO – Prolaktin, * Primer-Sequenz aus: (Lu, Richard u.a. 2014), ** Primer-Sequenz aus (Lin und Ge 2009), *** Primer-Sequenz wurde von Wibke Kleiner (IGB) designt.

2.4.2 Reproduktionsleistung – Eiqualität, Eigröße, Laichfrequenz und Eianzahl

Der RT wurde unter einem Tageszyklus von 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkel durchgeführt. Das künstliche Licht simuliert unter Laborbedingungen den Sonnenaufgang und induzierte bei den Fischen das Ablaichen. Nach dem Ablaichen wurden die Laichboxen gereinigt und der Laich von eventuell vorhandenen Futterresten und Fäkalien gesäubert. Die Eier wurden in Glaspetrischalen überführt, und mit einer Mikroskopkamera (Olympus XC50) wurden bei 50-facher Vergrößerung Bilder für die weitere Bearbeitung aufgenommen.

Die Embryonen wurden in vier verschiedene Kategorien eingeordnet: koaguliert, deformiert, unbefruchtet und normal entwickelt. Wenn die Embryonen erste Zeichen von Denaturierung aufwiesen, wurden sie der Gruppe der Koagulierten zugeordnet (auch unbefruchtete Eier).

Alle befruchteten Eier ohne Zeichen von Deformationen und Koagulation wurden als normal entwickelte Embryonen eingeordnet. Des Weiteren wurde in deformierte Embryonen und unbefruchtete Eier unterschieden.

Die Dottersackfläche wurde mit der Bildanalyse-Software AnalySIS 5.0 vermessen. Pro Replikat wurden dafür 120 Embryonen zufällig ausgewählt. Die Auswahl erfolgte von jeweils sechs verschiedenen, ebenfalls zufällig ausgewählten Tagen.

Die Laichfrequenz wurde als Laichereignis pro Laichgruppe und Tag aufgenommen. Außerdem wurden die Eier gezählt und als Eianzahl pro Gelege erfasst.

2.4.3 F1-Generation

Nach der Gewinnung, der Reinigung und dem Fotografieren der Eier wurden 50 befruchtete, normal entwickelte Eier des jeweiligen Replikates unter einem Binokularmikroskop sorgfältig aussortiert. Die so ausgewählten Embryonen wurden in einer belüfteten Petrischale im selben Testmedium wie ihre jeweiligen Elterntiere exponiert. Die Embryonen wurden bei einem Licht-Dunkelheit-Zyklus von 12/12 h bei 26°C in einem Brutschrank 8 Tage lang exponiert.

Alle 24 h wurde kontrolliert, ob Sterbe- und/oder Schlupfereignisse stattgefunden hatten. Neben Schlupf- und Mortalitätsraten wurden die Deformationsraten ermittelt. Dazu wurden die auftretenden Deformationen in 4 Kategorien eingeteilt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Übersicht und Beschreibung der aufgenommenen Deformationsparameter

Kategorien	Charakteristika
Herz- Kreislauf-System	Deformationen des Herz-Kreislauf-Systems wie Herzbeutelwassersucht, verlangsamter/fehlender Blutkreislauf, verlangsamter/fehlender Herzschlag, Hämatome
Wirbelsäule	Wirbelsäulendeformationen wie Lordose, Skoliose, Kyphose oder sonstige Deformationen, die auf eine Wirbeldislokation schließen lassen
Ödem	Ödeme an verschiedenen Stellen des Körpers, ausgenommen Herzbeutelwassersucht
Retardation/Deformation	Retardation/verlangsamte Entwicklung und sonstige Deformationen (z. B. fehlendes Auge), die aufgrund ihrer Seltenheit in eine Kategorie zusammengefasst wurden

Die deformierten Embryonen/Larven wurden nach Schweregraden unterteilt. Die Einteilung bezog sich dabei auf die Anzahl der Deformationen pro Individuum. Eine Deformation wurde als schwach, zwei Deformationen als moderat und drei und mehr Deformationen als schwer bzw. stark deformiert bezeichnet.

2.5 Early Life Stage Tests (ELST)

Der ELST wurde nach der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 230 (2009), dem 21-Tage Fisch-Screening-Assay und dem 96-Stunden Embryo-Larval-Test (ELT) (Nagel 2002) durchgeführt. Pro Expositionsgruppe wurden insgesamt 63 Tiere in jeweils 3 Replikaten (21 Tiere) exponiert. Die verwendeten Fischeier wurden kurz nach der Befruchtung aus den Zuchtbecken (Trichterbecken) entnommen. Es wurden nur normal entwickelte Eier ab dem 4-Zell-Stadium ausgewählt und in Glaskristallisierschalen in den jeweiligen temperierten (26°C) Testwässern exponiert. Für den 96-Stunden ELST wurden die Embryonen in Multiwell-Platten (24 Well) exponiert. Bei dem 21-Tage ELST wurden die Embryonen in Kristallisierschalen exponiert. Die Kristallisierschalen wurden mit Uhrglasschalen abgedeckt. Als Ktr wurde Standard-Verdünnungswasser nach ISO 7346-1 und ISO 7346-2 verwendet. Dieses Wasser wurde bei den Salzexpositionen den Zielkonzentrationen entsprechend aufgesalzen. Die Embryonen wurden bis zur Entwicklung in freischwimmende Larven im Brutschrank inkubiert (Temperatur 26°C, 12 h Tag- und Nachtzyklus). Um Verpilzung und erhöhten Keimdruck zu vermeiden, wurden täglich tote und verpilzte Embryonen und leere Eihüllen abgesaugt und ein Wasserwechsel vorgenommen.

Die freischwimmenden Larven wurden in 10 l Glasaquarien überführt und bis zum 21. Lebenstag aufgezogen. Als Aufzuchtfutter wurde ausschließlich Lebendfutter verwendet. Für einen ausreichend hohen Eiweiß- und Fettgehalt in der Nahrung wurde fünf Mal pro Tag mit *Artemia salina* Nauplien und Mikrowürmern (*Panagrellus redivivus*) gefüttert. In einem Vorversuch mit Zebrafischlarven in der Umstellungsphase von endogener zu exogener Ernährung wurde festgestellt, dass diese Futterkombination zu den geringsten Mortalitätsraten führte.

Alle zwei Tage wurde ein vollständiger Wasserwechsel durchgeführt. Durch hydro-pneumatische Innenfilter wurde eine ständige Belüftung und Filterung des Wassers gewährleistet. Außerdem wurden Sauerstoff-, Nitrit- und Ammoniumgehalt, pH-Wert, Temperatur und Leitfähigkeit 2 Mal pro Woche gemessen und kontrolliert.

Am Ende der Tests wurden die Larven mit 2-Phenoxyethanol anästhesiert und euthanasiert (Matthews und Varga 2012).

2.5.1 Toxikologische Endpunkte

Es wurde jeweils nach 48, 56, 64, 72, 80, 88 und 96 Stunden kontrolliert, ob ein Schlupf erfolgt war. Die Sterblichkeit wurde alle 24 Stunden überprüft.

Die Körperlänge und Körpermasse der Larven wurden jeweils am Ende des Tests ermittelt. Dafür wurden sie mit 2-Phenoxyethanol getötet und mit destilliertem Wasser abgespült. Für die Körperlänge wurden die Fische unter einem Binokular (Olympus XC50) fotografiert und die Länge mit der Messsoftware (AnalySIS 5.0) auf 0,1 mm genau bestimmt. Zur Bestimmung der Trockenmasse wurden die Fischlarven bei -20°C gefriergetrocknet. Vor der Massenbestimmung mit einer Feinwaage (Sartorius - Research R200D) wurden die Fischlarven bei 105°C im Trockenschrank über Nacht getrocknet und anschließend in einem Exsikkator aufbewahrt.

Die Deformationsraten wurden alle 24 h bestimmt. Die toxikologischen Endpunkte und ihre Erfassung sind in der nachstehenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 15: Toxikologische Endpunkte und ihre Erfassungszeiten

Endpunkte	Expositionszeit [h]			
	24	48	72	96
Koagulation	•	•	•	•
Schwanzablösung	•			
Anlage der Somiten	•	•		
Herzschlag und Blutkreislauf		•	•	•
Pigmentation		•	•	
Augenentwicklung	•			
Ödeme	•	•	•	•
Herzbeutelwassersucht		•	•	•
Retardation der Entwicklung	•	•	•	•
Deformationen der Wirbelsäule	•	•	•	•
Deformationen (sonstige)	•	•	•	•

Die Herzfrequenzen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen (48 h, 72 h und 96 h) nach der Befruchtung (pf) gemessen. Die Herzschläge pro Minute wurden pro Individuum durch Zählen dreifach bestimmt.

Für die Bestimmung des Mineralgehaltes wurden die Fischlarven innerhalb der jeweiligen Expositionsgruppen so gebündelt, dass eine Mindestmasse von 2 mg erreicht wurde. Die

getrockneten Larven wurden in 15 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 5 ml 65%iger Salpetersäure (Merck) und 0,5 ml 30%igem Wasserstoffperoxid (10:1 v/v) versetzt (Espinoza-Quiñones, Módenes u.a. 2010). Die Proben wurden im Wasserbad (bei 100°C) so lang erhitzt, bis sie sich vollständig auflösten. Die Mineralgehalte (Mg, Ca, Na, K, P und S) der Lösungen wurden mittels Flammen-AAS (PinAAcle™ 900T) bestimmt.

2.6 Statistik

Alle Daten wurden mit dem Statistik-Programm SPSS (IBM SPSS Statistics 22) analysiert. Die Diagramme wurden ebenfalls mit diesem Programm erstellt. Bei allen Datensätzen wurde auf das Vorliegen von Varianzhomogenität (Levene-Test) und Normalverteilung (Schapiro-Wilk-Test) geprüft. Konnten diese Voraussetzungen erfüllt werden, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Wies diese auf signifikante Unterschiede zwischen den Expositionsgruppen hin, wurden als Post-hoc-Tests Least Significant Difference (LSD) Tests durchgeführt. Alle Expositionsgruppen wurden mit der Ktr verglichen. Die p-Werte dieser Mehrfachvergleiche wurden mit der Bonferroni-Methode korrigiert.

Konnten die Voraussetzungen für eine ANOVA auch nach einer Transformation der Daten nicht erfüllt werden, wurde alternativ ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Wies der Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede zwischen den Expositionsgruppen auf, wurden als Post-hoc-Tests paarweise Gruppenvergleiche nach Dunn durchgeführt (Dunn 1964). Die p-Werte dieser Mehrfachvergleiche wurden mittels Bonferroni-Korrektur angepasst.

Für die Beurteilung der Relevanz von signifikanten Ergebnissen wurden Effektstärken errechnet. Bei den Kruskal-Wallis-Tests wurde zur Bestimmung der Unterschiede zwischen den Medianen der Korrelationskoeffizient r berechnet. Dieser wurde aus dem z-Wert und der Stichprobengröße n berechnet. Ein Wert unter 0,3 gilt als geringer Effekt, zwischen 0,3 und 0,5 als mittlerer und ein Wert größer als 0,5 gilt als starker Effekt.

$$r = \frac{z}{\sqrt{n}}$$

Als Effektstärkemaß für den Vergleich von zwei Mittelwerten wurde für die ANOVA Cohens d verwendet. Berechnet wird d aus der Differenz der beiden Mittelwerte, geteilt durch die

Standardabweichung der Kontrolle. Ein Wert kleiner als 0,5 wird als geringer Effekt, Werte zwischen 0,5 und 0,8 als mittlerer und Werte darüber als starker Effekt gewertet.

$$d = \frac{M_1 + M_2}{SD}$$

Zur Analyse der Mortalitäts- und der Schlupfraten wurden Kaplan-Meier-Verfahren verwendet. Zum deskriptiven Vergleich der Expositionen dienten Kaplan-Meier-Kurven. Für den statistischen Vergleich der Expositionsgruppen wurde das Log-rank-Testverfahren verwendet. Konnten statistische signifikante Unterschiede festgestellt werden, wurden die Expositionsgruppen paarweise untereinander verglichen.

Für die Analyse des Laichverhaltens wurde das Verfahren der Cox-Regression verwendet. Dabei wurden die Zeit bis zum Eintritt eines Laichereignisses und die Eianzahl des Geleges der Expositionsgruppen über den Beobachtungszeitraum mit der Ktr verglichen. Außerdem konnte mit der Hazardrate, also der Ereigniswahrscheinlichkeit (hier Laichereignis), ein Schätzer für die Stärke der Effekte der Expositionen angegeben werden.

3. Ergebnisse

3.1 Reproduktionstest

3.1.1 Einfluss von Ionenimbilanzen auf die Elterngeneration

3.1.1.1 Ovarien

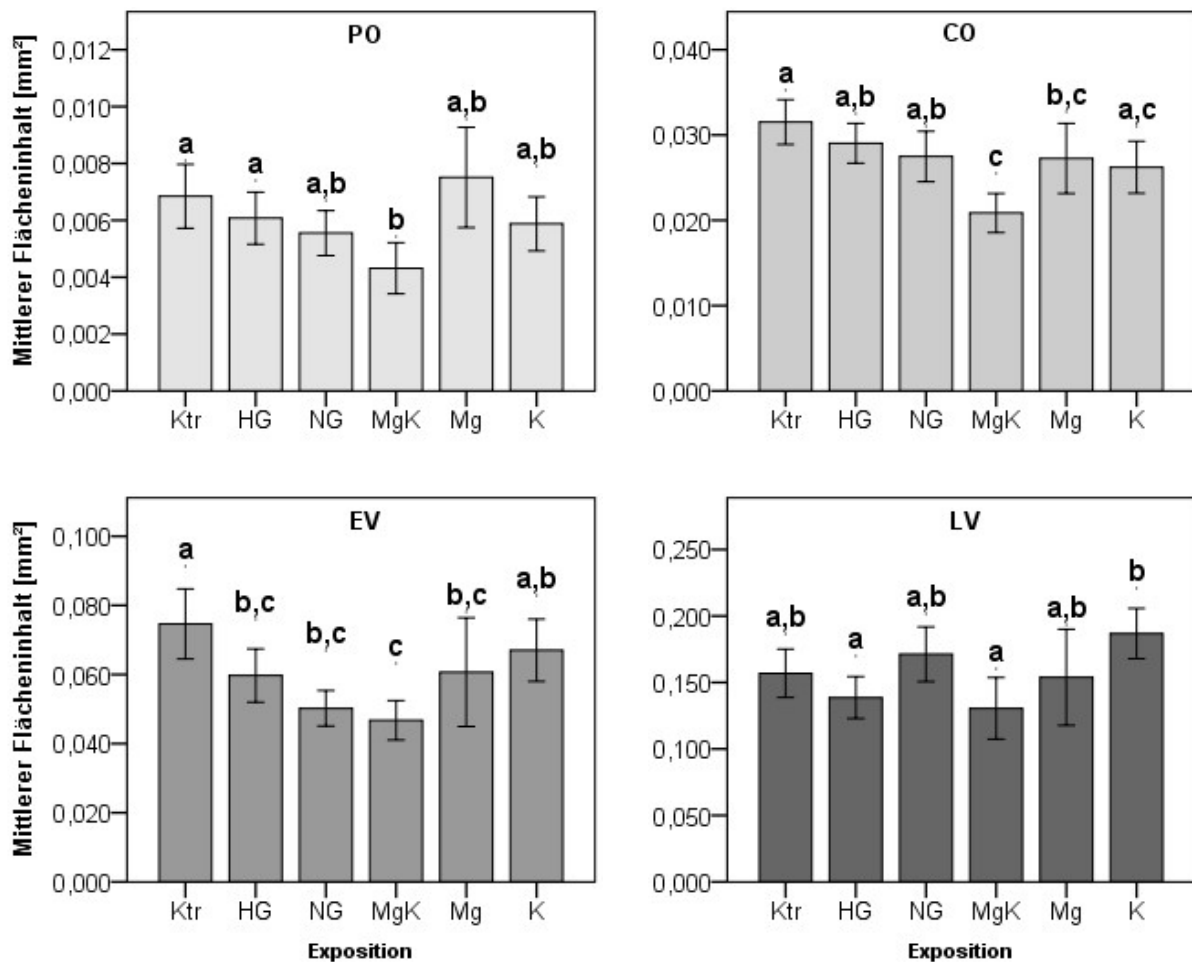


Abbildung 3: Mittlere Oozytengrößen der vier verschiedenen Reifestadien: PO = Perinukleolare Oozyten, CO = Kortikale/alveoläre Oozyten, EV = Frühvitellogene Oozyten und LV = Spätvitellogene Oozyten. Die Mittelwerte wurden aus 5 Replikaten (n = 10) pro Expositionsgruppe errechnet. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm dargestellt. Die Expositionsgruppen sind auf der X-Achse dargestellt als: Ktr = Kontrolle, HG = Hoher Grenzwert, NG = Niedriger Grenzwert, MgK = erhöhte Mg^{2+} - und K^+ -Konzentrationen, Mg = erhöhte Mg^{2+} -Konzentrationen, K = erhöhte K^+ -Konzentrationen.

Die mittleren Oozytengrößen aller vier Reifestadien, der perinukleolaren Oozyten ($\chi^2(5) = 20,032$, $p = 0,001$), der kortikalen/alveolären Oozyten ($\chi^2(5) = 20,032$, $p < 0,001$), der

frühvitellogenen ($\chi^2(5) = 32,414$, $p = 0,001$) und der spätvitellogenen Oozyten ($\chi^2(5) = 19,674$, $p < 0,001$) unterschieden sich signifikant. In allen vier Reifestadien wies die MgK die kleinsten Oozyten auf (Abbildung 3). Im perinukleolaren, kortikalen/alveolären und frühvitellogenen Stadium waren die Oozyten der Tiere der MgK signifikant kleiner als bei den Tieren der Kontrolle (Tabelle 16). Im spätvitellogenen Reifestadium waren die Oozyten der HG und MgK signifikant kleiner als die der K. Die Effekte waren moderat bis stark.

Tabelle 16: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die mittleren Zellgrößen der perinukleolaren, kortikalen/alveolären, frühvitellogenen und spätvitellogenen Oozyten (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)

		Mittelwert \pm SD	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke
		Oozytengröße in μm^2	Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
PO	Ktr	0,007 \pm 0,0047										
	HG	0,006 \pm 0,0038	1,000	0,070								
	NG	0,006 \pm 0,0033	1,000	0,154	1,000	0,084						
	MgK	0,004 \pm 0,0034	0,000	0,375	0,008	0,305	0,183	0,222				
	Mg	0,008 \pm 0,0077	1,000	0,123	1,000	0,053	1,000	0,031	0,055	0,251		
	K	0,006 \pm 0,0039	1,000	0,120	1,000	0,050	1,000	0,034	0,060	0,256	1,000	0,003
CO	Ktr	0,032 \pm 0,0098										
	HG	0,029 \pm 0,0092	1,000	0,104								
	NG	0,027 \pm 0,0111	0,408	0,207	1,000	0,099						
	MgK	0,021 \pm 0,0085	0,000	0,486	0,001	0,378	0,047	0,279				
	Mg	0,027 \pm 0,0166	0,010	0,308	0,319	0,213	1,000	0,101	0,794	0,177		
	K	0,026 \pm 0,0123	0,053	0,264	1,000	0,160	1,000	0,057	0,235	0,221	1,000	0,044
EV	Ktr	0,075 \pm 0,0295										
	HG	0,060 \pm 0,0228	0,049	0,349								
	NG	0,050 \pm 0,0147	0,000	0,530	1,000	0,180						
	MgK	0,047 \pm 0,0150	0,000	0,605	0,581	0,256	1,000	0,077				
	Mg	0,061 \pm 0,0458	0,000	0,530	1,000	0,181	1,000	0,001	1,000	0,077		
	K	0,067 \pm 0,0263	1,000	0,200	1,000	0,150	0,092	0,330	0,017	0,406	0,085	0,331
LV	Ktr	0,157 \pm 0,0459										
	HG	0,139 \pm 0,0501	1,000	0,151								
	NG	0,171 \pm 0,0643	1,000	0,136	0,126	0,293						
	MgK	0,131 \pm 0,0573	1,000	0,215	1,000	0,060	0,074	0,346				
	Mg	0,154 \pm 0,0949	1,000	0,053	1,000	0,100	1,000	0,189	1,000	0,162		
	K	0,187 \pm 0,0534	0,979	0,238	0,011	0,391	1,000	0,100	0,008	0,451	0,326	0,291

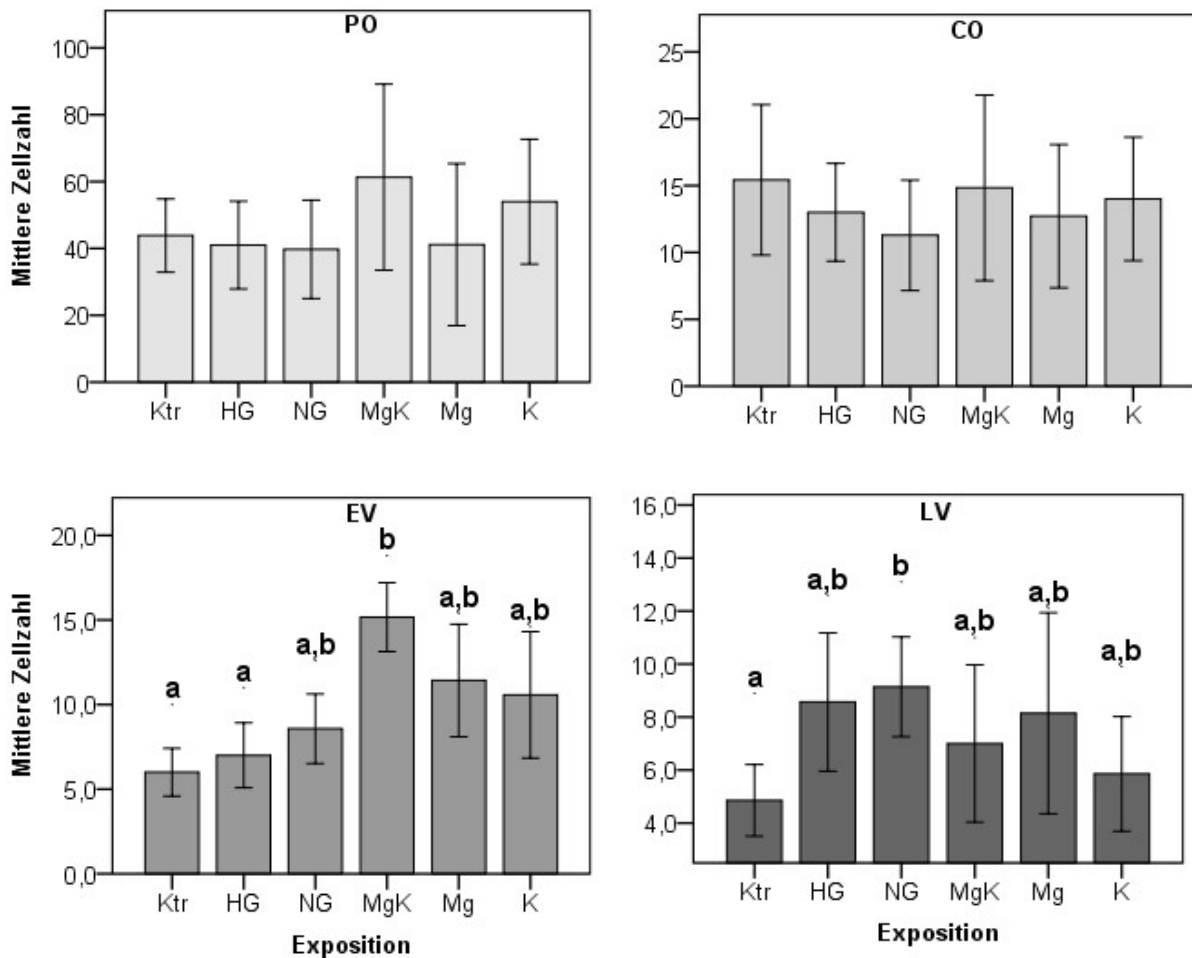


Abbildung 4: Mittlere Zellanzahl der Oozyten in vier verschiedenen Reifestadien. Die Reifestadien sind jeweils in einem eigenen Diagramm dargestellt: PO = Perinukleolare Oozyten, CO = Kortikale/alveoläre Oozyten, EV = Frühvitellogene Oozyten, LV = Spätvitellogene Oozyten. Dabei wurde der Mittelwert aus den 5 Replikaten (n = 10) pro Expositionsgruppe errechnet. Die Streuung der Daten wurde als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm dargestellt.

Die mittleren Zellanzahlen der beiden früheren Reifestadien perinukleolare Oozyten ($\chi^2(5) = 5,304$, $p = 0,380$) und kortikale/alveoläre Oozyten ($\chi^2(5) = 2,815$, $p = 0,728$) unterschieden sich nicht signifikant (siehe Abbildung 4). Bei den frühvitellogenen ($\chi^2(5) = 22,234$, $p < 0,001$) und spätvitellogenen ($\chi^2(5) = 12,428$, $p = 0,029$) Oozyten ergaben sich jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen. Bei beiden Reifestadien wies die Ktr die niedrigsten mittleren Zellanzahlen auf (Abbildung 4). Allerdings erwiesen sich nur die Unterschiede zur MgK-Gruppe bei den frühvitellogenen Oozyten und zur NG bei den spätvitellogenen Oozyten als signifikant (Tabelle 17). Die Anzahl frühvitellogener Oozyten der HG waren ebenfalls signifikant niedriger als bei der MgK. Die Effektstärke war bei diesen Gruppenvergleichen moderat bis stark.

Tabelle 17: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Anzahl der frühvitellogenen und spätvitellogenen Oozyten (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)

	Mittelwert ±SD	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke
	Zellanzahl	Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
EV	Ktr	6,0 ± 1,53									
	HG	7,0 ± 2,08	1,000	0,168							
	NG	8,6 ± 2,23	1,000	0,413	1,000	0,246					
	MgK	15,2 ± 1,94	0,001	1,088	0,008	0,927	0,146	0,691			
	Mg	11,4 ± 3,6	0,076	0,749	0,445	0,581	1,000	0,335	1,000	0,368	
	K	10,6 ± 4,04	0,232	0,671	1,000	0,497	1,000	0,242	1,000	0,484	1,000 0,106
LV	Ktr	4,9 ± 1,46									
	HG	8,6 ± 2,82	0,209	0,657							
	NG	9,1 ± 2,04	0,044	0,795	1,000	0,138					
	MgK	7,0 ± 2,83	1,000	0,381	1,000	0,274	1,000	0,412			
	Mg	8,1 ± 4,1	0,959	0,495	1,000	0,162	1,000	0,300	1,000	0,113	
	K	5,9 ± 2,34	1,000	0,168	1,000	0,489	0,284	0,627	1,000	0,213	1,000 0,327

3.1.1.2 Testes

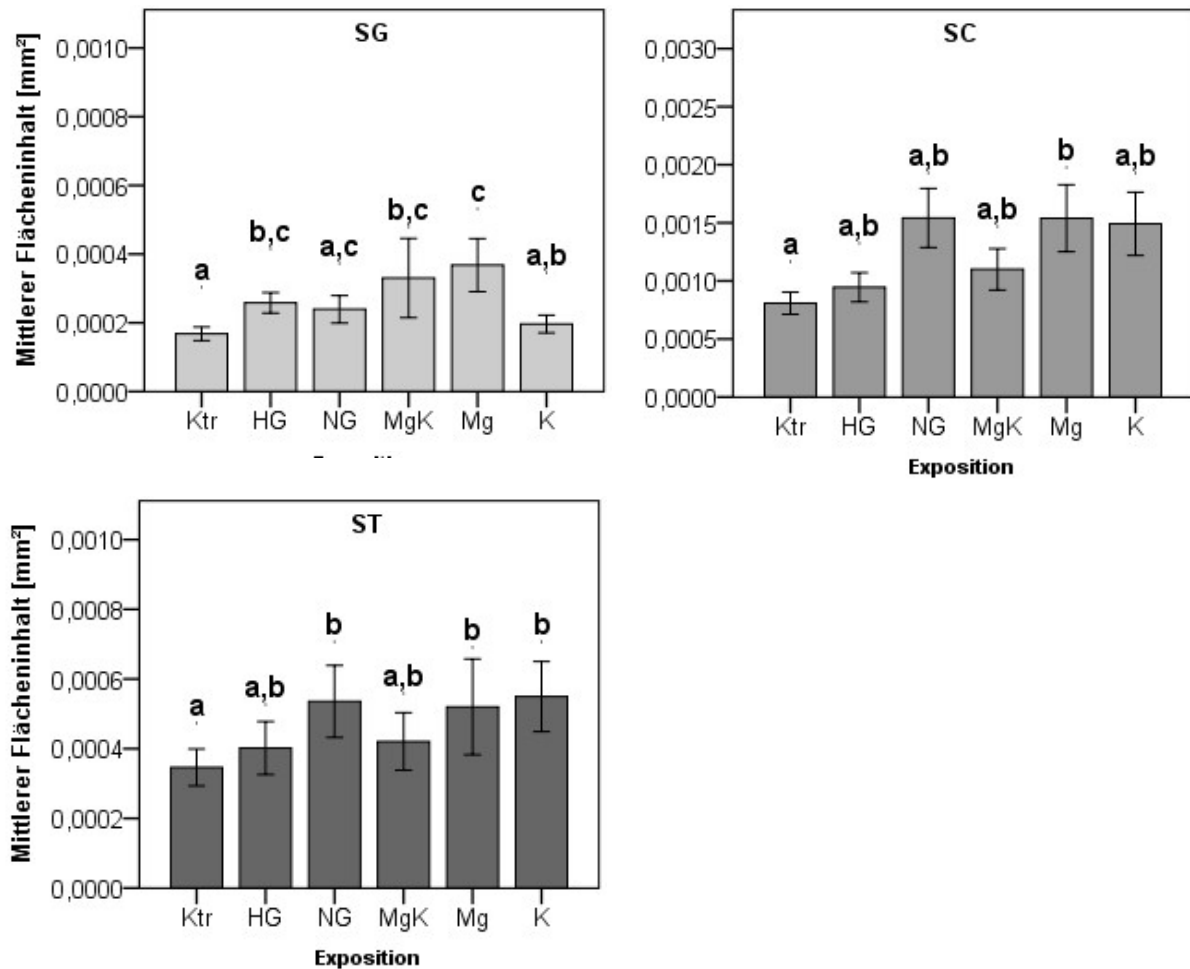


Abbildung 5: Mittlere relative Häufigkeiten der Spermatozyten in drei verschiedenen Reifestadien: SG = Spermatogonien, SC = Spermatozyten und ST = Spermatiden. Die Mittelwerte wurden aus 5 Replikaten (n = 10) pro Expositionsgruppe errechnet. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm dargestellt.

Bei allen drei untersuchten Reifestadien der männlichen Gametozyten wurden signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen festgestellt (Spermatogonien: $\chi^2(5) = 28,953$, $p < 0,001$; Spermatozyten: $\chi^2(5) = 28,540$, $p < 0,001$ und Spermatiden: $\chi^2(5) = 25,578$, $p < 0,001$). Die Ktr wies bei den Spermatozyten, den Spermatiden und bei den Spermatogonien neben der K jeweils die kleinsten relativen Häufigkeiten aller Testgruppen auf (Abbildung 5).

Die Ktr wies signifikant weniger Spermatogonien auf als die HG, MgK und Mg (Tabelle 18). Spermatozyten waren in der Mg signifikant häufiger vertreten als in der Ktr. Die NG, Mg und K wiesen signifikant häufiger Zellen im Reifestadium der Spermatiden auf als die Ktr. Die Effektgrößen aller Vergleiche wiesen auf schwache Effekte hin (Tabelle 18).

Tabelle 18: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die relative Häufigkeit der spermatogenen Zellen (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)

		Mittelwert \pm SD	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke
		Flächeninhalt in mm ²	Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
SC	Ktr	0,0002 \pm 0,0001										
	HG	0,0003 \pm 0,0002	0,004	0,264								
	NG	0,0002 \pm 0,0002	0,413	0,181	1,000	0,088						
	MgK	0,0003 \pm 0,0007	0,005	0,242	1,000	0,015	1,000	0,072				
	Mg	0,0004 \pm 0,0004	0,000	0,365	1,000	0,095	0,256	0,186	1,000	0,108		
	K	0,0002 \pm 0,0001	1,000	0,098	0,284	0,169	1,000	0,082	0,383	0,150	0,008	0,268
SC	Ktr	0,0008 \pm 0,0007										
	HG	0,0009 \pm 0,0009	1,000	0,060								
	NG	0,0015 \pm 0,0014	0,000	0,241	0,017	0,183						
	MgK	0,0011 \pm 0,0011	1,000	0,083	1,000	0,023	0,092	0,163				
	Mg	0,0015 \pm 0,0017	0,002	0,214	0,075	0,156	1,000	0,029	0,327	0,135		
	K	0,0015 \pm 0,0016	0,075	0,154	1,000	0,096	1,000	0,091	1,000	0,074	1,000	0,061
ST	Ktr	0,0003 \pm 0,0003										
	HG	0,0004 \pm 0,0003	1,000	0,111								
	NG	0,0005 \pm 0,0004	0,002	0,279	0,699	0,184						
	MgK	0,0004 \pm 0,0004	1,000	0,100	1,000	0,016	0,331	0,199				
	Mg	0,0005 \pm 0,0006	0,015	0,234	1,000	0,129	1,000	0,054	1,000	0,145		
	K	0,0006 \pm 0,0004	0,002	0,266	1,000	0,161	1,000	0,022	0,503	0,178	1,000	0,032

3.1.1.3 Kiemen

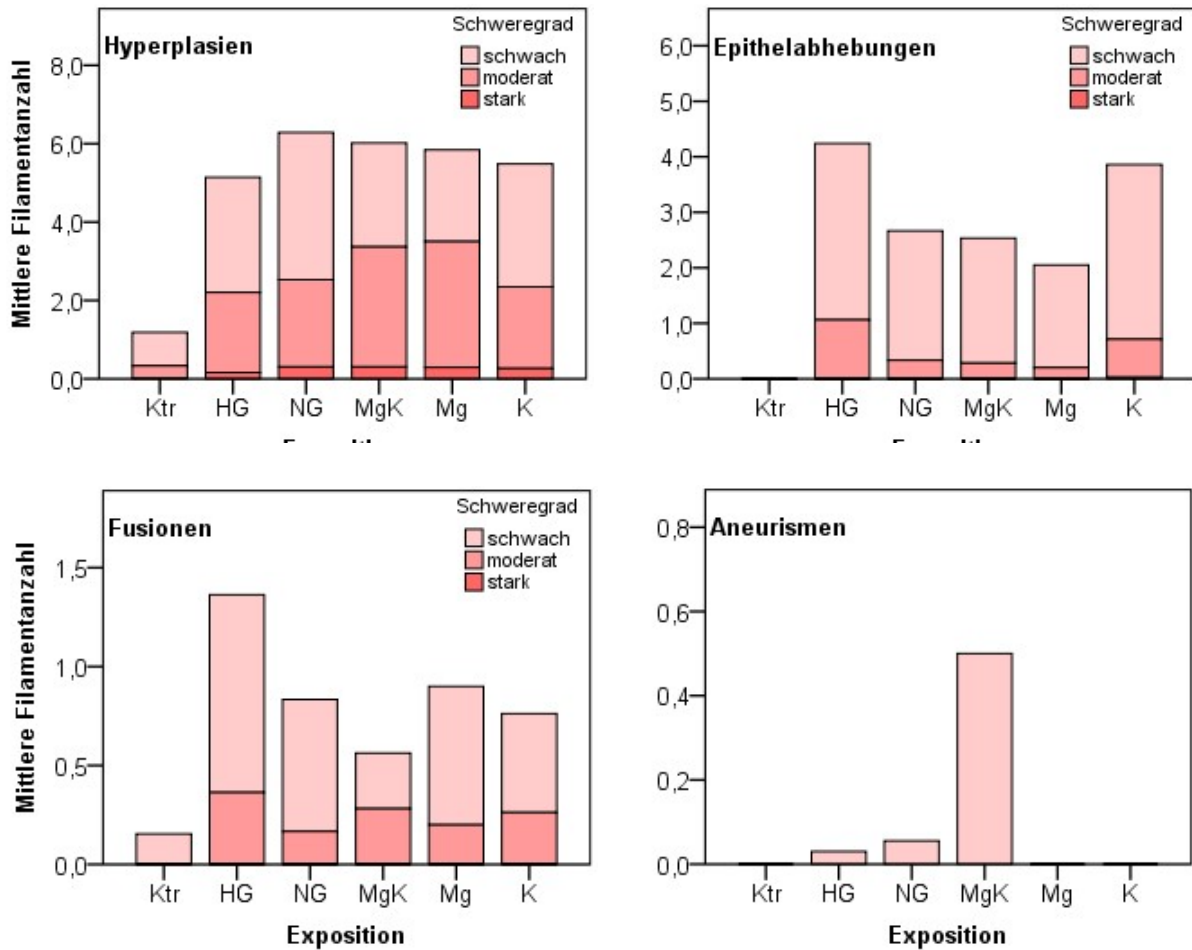


Abbildung 6: Mittelwert der durch Hyperplasien, Epithelabhebungen, Fusionen und Aneurismen beeinträchtigten Kiemenfilamente. Die untersuchten Symptome wurden in die Schweregrade leicht, mittel und schwer unterschieden. Die Mittelwerte wurden aus 5 Replikaten ($n = 20$) pro Expositionsgruppe errechnet. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm dargestellt.

Bei den Testgruppen wurden signifikante Unterschiede beim Vorkommen von schwachen ($\chi^2(5) = 41,379$, $p < 0,001$), moderaten ($\chi^2(5) = 41,185$, $p < 0,001$) und starken Hyperplasien ($\chi^2(5) = 22,918$, $p < 0,001$) festgestellt. Die Tiere in den Expositionen wiesen im Mittel signifikant mehr schwache und moderate Hyperplasien an ihren Kiemenfilamenten auf als die Tiere der Ktr. An den Kiemenfilamenten der Tiere der MgK wurden signifikant mehr starke Hyperplasien als in der Ktr festgestellt (Tabelle 19).

Das Vorkommen von schwachen ($\chi^2(5) = 52,799$, $p < 0,001$) und moderaten Epithelabhebungen ($\chi^2(5) = 22,592$, $p < 0,001$) unterschied sich ebenfalls signifikant zwischen den Testgruppen (Abbildung 6). Die Tiere der Expositionen wiesen signifikant mehr schwache Epithelabhebungen auf als die Tiere der Ktr. Signifikant mehr moderate Epithelabhebungen wurden nur bei der HG und K festgestellt (Tabelle 19).

Hyperplasien und Epithelabhebungen waren die häufigsten Symptome. Fusionen und in noch geringerem Maße Aneurismen wurden deutlich seltener festgestellt (Abbildung 6). Die Häufigkeit der schwachen Fusionen unterschied sich zwischen den Testgruppen signifikant ($\chi^2(5) = 13,349$, $p = 0,020$). In der NG und MgK wurden signifikant mehr Fusionen der Kiemenfilamente als in der Ktr festgestellt (Tabelle 19).

Tabelle 19: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für Hyperplasien, Epithelabhebungen und Fusionen der Kiemenfilamente (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)

		Mittelwert ±SD	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke
			Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
Hyperplasien	schwach	Ktr	0,9 ± 1,48									
		HG	2,9 ± 3,87	0,000	0,285							
		NG	3,8 ± 4,46	0,000	0,370	1,000	0,084					
		MgK	2,7 ± 3,25	0,001	0,268	1,000	0,016	1,000	0,100			
		Mg	2,3 ± 3,27	0,023	0,206	1,000	0,080	0,200	0,164	1,000	0,064	
		K	3,1 ± 3,56	0,000	0,344	1,000	0,058	1,000	0,026	1,000	0,073	0,454 0,138
	moderat	Ktr	0,3 ± 0,90									
		HG	2,0 ± 3,32	0,000	0,312							
		NG	2,2 ± 3,48	0,000	0,332	1,000	0,019					
		MgK	3,1 ± 3,94	0,000	0,445	0,922	0,134	1,000	0,114			
		Mg	3,2 ± 4,92	0,000	0,364	1,000	0,051	1,000	0,032	1,000	0,082	
		K	2,1 ± 4,04	0,001	0,254	1,000	0,058	1,000	0,078	0,066	0,191	1,000 0,110
	schwer	Ktr	0,0 ± 0,21									
		HG	0,2 ± 0,71	1,000	0,078							
		NG	0,3 ± 1,00	0,047	0,197	1,000	0,118					
		MgK	0,3 ± 0,92	0,039	0,206	1,000	0,129	1,000	0,010			
		Mg	0,3 ± 1,18	0,353	0,147	1,000	0,068	1,000	0,050	1,000	0,060	
		K	0,3 ± 1,06	0,464	0,138	1,000	0,059	1,000	0,059	1,000	0,068	1,000 0,009
Epithelabhebungen	schwach	Ktr	0,9 ± 1,48									
		HG	2,9 ± 3,87	0,000	0,541							
		NG	3,8 ± 4,46	0,000	0,591	1,000	0,032					
		MgK	2,7 ± 3,25	0,000	0,731	0,922	0,208	1,000	0,198			
		Mg	2,3 ± 3,27	0,000	0,675	1,000	0,094	1,000	0,055	1,000	0,142	
		K	3,1 ± 3,56	0,001	0,464	1,000	0,101	1,000	0,135	0,066	0,331	1,000 0,191
	moderat	Ktr	0,3 ± 0,90									
		HG	2,0 ± 3,32	0,000	0,499							
		NG	2,2 ± 3,48	0,978	0,213	0,254	0,288					
		MgK	3,1 ± 3,94	1,000	0,163	0,099	0,337	1,000	0,049			
		Mg	3,2 ± 4,92	1,000	0,128	0,023	0,371	1,000	0,084	1,000	0,036	
		K	2,1 ± 4,04	0,024	0,350	1,000	0,150	1,000	0,139	1,000	0,185	0,659 0,223
	schwach	Ktr	0,2 ± 0,49									
		HG	1,0 ± 2,37	1,000	0,136							
		NG	0,7 ± 1,39	0,047	0,341	1,000	0,205					
		MgK	0,3 ± 1,28	0,039	0,358	1,000	0,223	1,000	0,018			
		Mg	0,7 ± 1,40	0,353	0,255	1,000	0,118	1,000	0,087	1,000	0,104	
		K	0,5 ± 1,04	0,464	0,240	1,000	0,103	1,000	0,101	1,000	0,118	1,000 0,015

3.1.1.4 Ganzkörpercortisol

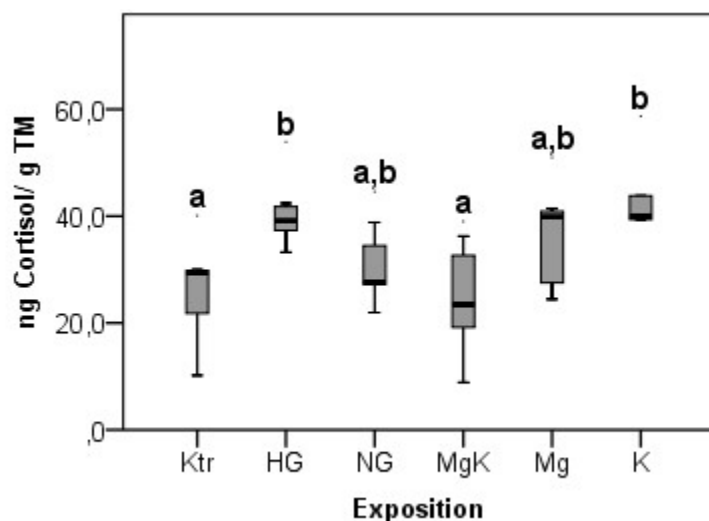


Abbildung 7: Ganzkörpercortisol der adulten Tiere am Ende des Tests. Mediane, Quartile und Extremwerte (dargestellt als Boxplot) wurden aus 5 Replikaten ($n = 6$) pro Expositionsgruppe errechnet.

Die mittleren Cortisolwerte der Expositionsgruppen unterschieden sich signifikant ($\chi^2(5) = 18,862$, $p = 0,002$). Bei der HG und der K wurden höhere Cortisolwerte als bei den Tieren der Ktr und MgK festgestellt (siehe Abbildung 7). Diese Unterschiede waren signifikant und zeigten moderate bis starke Effekte (Tabelle 20).

Tabelle 20: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Cortisolwerte (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)

	Mittelwert ±SD	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke
		Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
Ktr	25,07 ± 7,93										
HG	38,85 ± 3,39	0,050	0,744								
NG	29,62 ± 6,03	1,000	0,127	0,163	0,617						
MgK	23,97 ± 10,03	1,000	0,079	0,022	0,823	2,381	0,206				
Mg	35,69 ± 7,61	0,259	0,562	2,643	0,182	0,659	0,435	0,132	0,641		
K	43,73 ± 12,19	0,020	0,831	3,816	0,087	0,074	0,704	0,008	0,910	1,758	0,269

3.1.1.5 Hypophysenhormone

3.1.1.5.1 Gonadotropine – FSH und LH

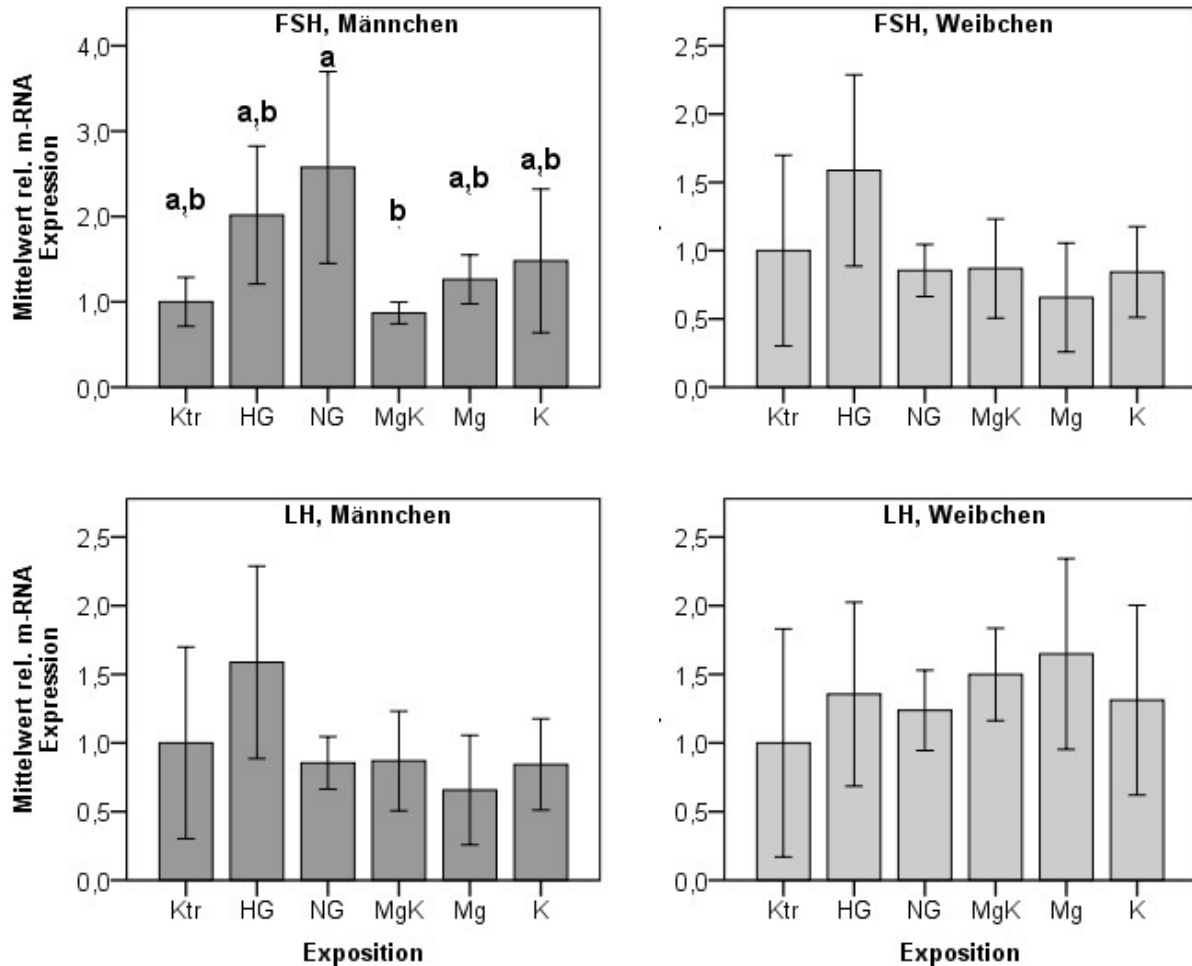


Abbildung 8: Mittelwerte der relativen m-RNA-Expression von Luteinisierendem (LH) und Follikelstimulierendem Hormon (FSH) zum Ende des Tests bei Männchen und Weibchen. Die Mittelwerte werden relativ zu den Kontrollwerten dargestellt. Die Mittelwerte wurden aus 5 Replikaten ($n = 10$) pro Expositionsguppe errechnet. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm abgebildet.

Nur bei den Männchen ergaben sich durch die Salzbehandlungen signifikante Unterschiede bei der Expression von FSH ($\chi^2(5) = 22,796$, $p < 0,001$), (Abbildung 8). Die FSH-Expression war bei der NG signifikant höher als bei der MgK (Tabelle 21). Der Effekt war stark. Bei den Weibchen wurden keine signifikanten Effekte von erhöhten Salzkonzentrationen auf die FSH-Expression festgestellt ($\chi^2(5) = 10,277$, $p = 0,068$). Die LH-Expression unterschied sich weder bei den Weibchen ($\chi^2(5) = 1,590$, $p = 0,902$) noch bei den Männchen ($\chi^2(5) = 9,220$, $p = 0,101$) signifikant zwischen den Testgruppen.

Tabelle21: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die relativen m-RNA-Expressionen von FSH (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)

	Mittelwert ±SD	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke
		Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
FSH, Männchen	Ktr	1,00 ± 0,23									
	HG	2,02 ± 0,87	0,577	0,598							
	NG	2,57 ± 1,22	0,088	0,795	1,000	0,200					
	MgK	0,87 ± 0,10	1,000	0,200	0,089	0,794	0,009	0,992			
	Mg	1,26 ± 0,27	1,000	0,303	1,000	0,301	1,000	0,501	1,000	0,501	
	K	1,48 ± 0,80	1,000	0,322	1,000	0,281	1,000	0,481	1,000	0,521	1,000 0,020

3.1.1.5.2 Wachstumshormon und Prolaktin

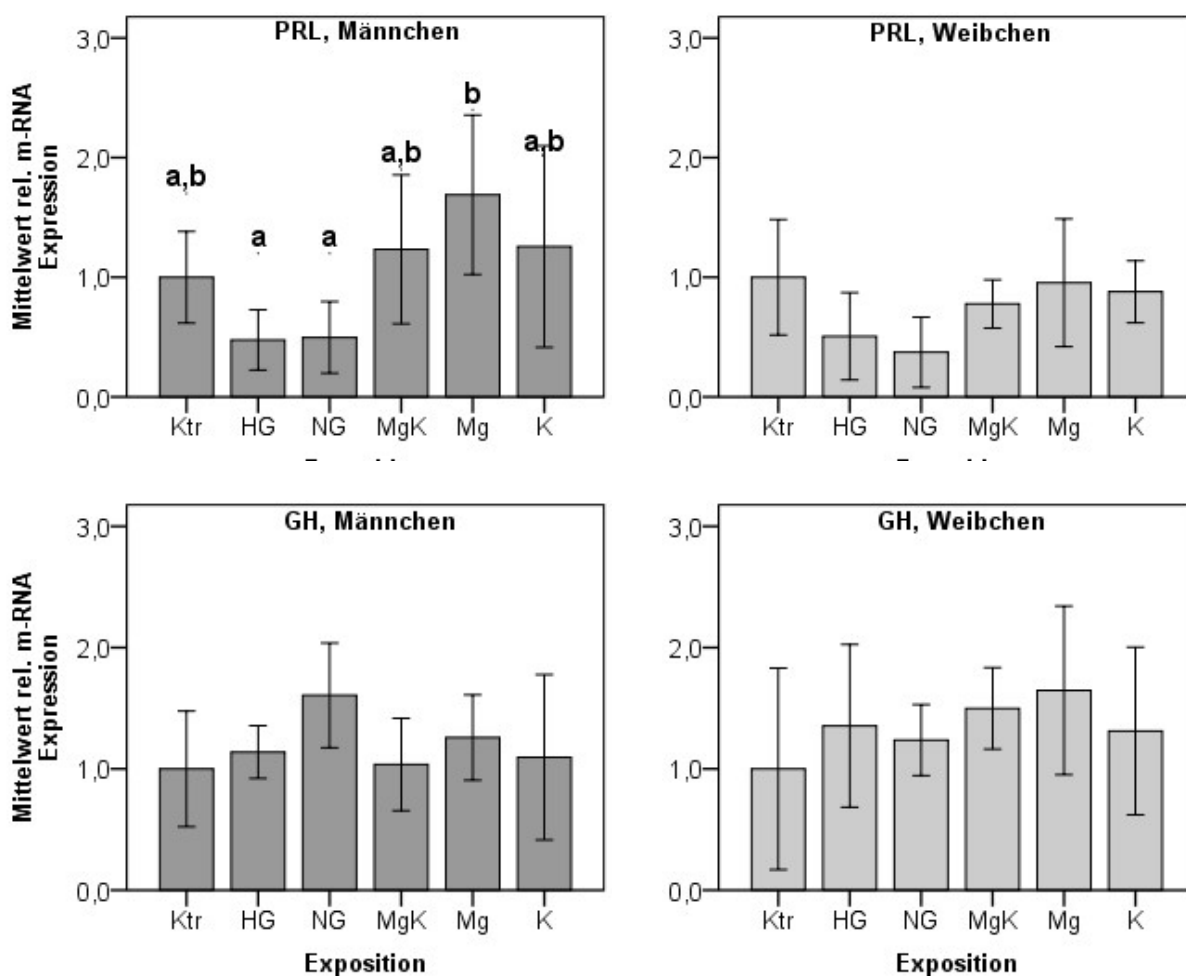


Abbildung 9: Mittelwerte der relativen m-RNA-Expression von Wachstumshormon (GH) und Prolaktin (PRL) zum Ende des Tests bei Männchen und Weibchen. Die Mittelwerte (aus 5 Replikaten, $n = 10$ pro Exposition) werden relativ zu den Kontrollwerten dargestellt. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm abgebildet.

Ergebnisse

Die Salzexpositionen hatten keinen signifikanten Effekt auf die Expressionsniveaus von GH, weder bei den Männchen ($\chi^2(5) = 10,624$, $p = 0,059$) noch bei den Weibchen ($\chi^2(5) = 4,629$, $p = 0,463$, Abbildung 9). Mit Blick auf die Genexpression von PRL wurden bei Männchen ($\chi^2(5) = 18,743$, $p = 0,002$) und Weibchen ($\chi^2(5) = 13,710$, $p = 0,018$) signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen nachgewiesen. In paarweisen Vergleichen der Testgruppen konnten bei den Weibchen keine signifikanten Unterschiede bestätigt werden. Nur die Männchen der HG und NG wiesen signifikant geringere Expressionen von PRL auf als die der Mg (Tabelle 22).

Tabelle 22: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die relativen m-RNA-Expressionen von PRL (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)

		Mittelwert ±SD	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke
			Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
PRL, Weibchen	Ktr	1,00 ± 0,30										
	HG	0,51 ± 0,40	0,370	0,677								
	NG	0,37 ± 0,28	0,143	0,820	1,000	0,132						
	MgK	0,78 ± 0,16	1,000	0,219	1,000	0,477	0,626	0,614				
	Mg	0,95 ± 0,51	1,000	0,114	0,520	0,586	0,189	0,720	1,000	0,103		
	K	0,88 ± 0,21	1,000	0,126	0,730	0,569	0,286	0,707	1,000	0,093	1,000	0,010
PRL, Männchen	Ktr	1,00 ± 0,31										
	HG	0,48 ± 0,27	0,826	0,554								
	NG	0,50 ± 0,29	1,000	0,516	1,000	0,044						
	MgK	1,23 ± 0,50	1,000	0,141	0,247	0,692	0,444	0,656				
	Mg	1,69 ± 0,64	1,000	0,405	0,007	0,966	0,020	0,925	1,000	0,265		
	K	1,26 ± 0,68	1,000	0,131	0,271	0,683	0,483	0,646	1,000	0,010	1,000	0,275

3.1.1.6 Gonadosomatischer Index (GSI)

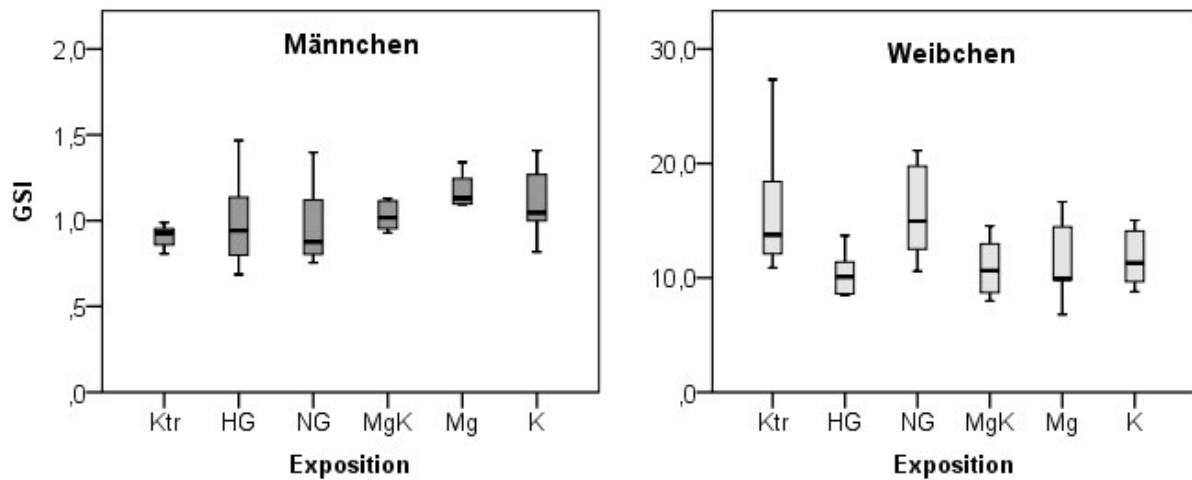


Abbildung 10: Gonadosomatischer Index von Männchen und Weibchen am Ende des Tests. Die Männchen und Weibchen wurden getrennt erfasst. Mediane, Quartile und Extremwerte (dargestellt als Boxplot) wurden aus 5 Replikaten ($n = 10$) pro Expositionsgruppe errechnet.

Ein weiterer Indikator für den Einfluss der Salzexpositionen auf die Gonadenentwicklung war der gonadosomatische Index. Die gonadosomatischen Indizes der Weibchen wiesen zwar generelle Unterschiede zwischen den Testgruppen auf ($\chi^2(5) = 11,087$, $p = 0,050$; Abbildung 10). In Post-hoc-Tests konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede bei einzelnen Gruppenvergleichen nachgewiesen werden.

3.1.1.7 Relativer Konditionsfaktor (RKF)

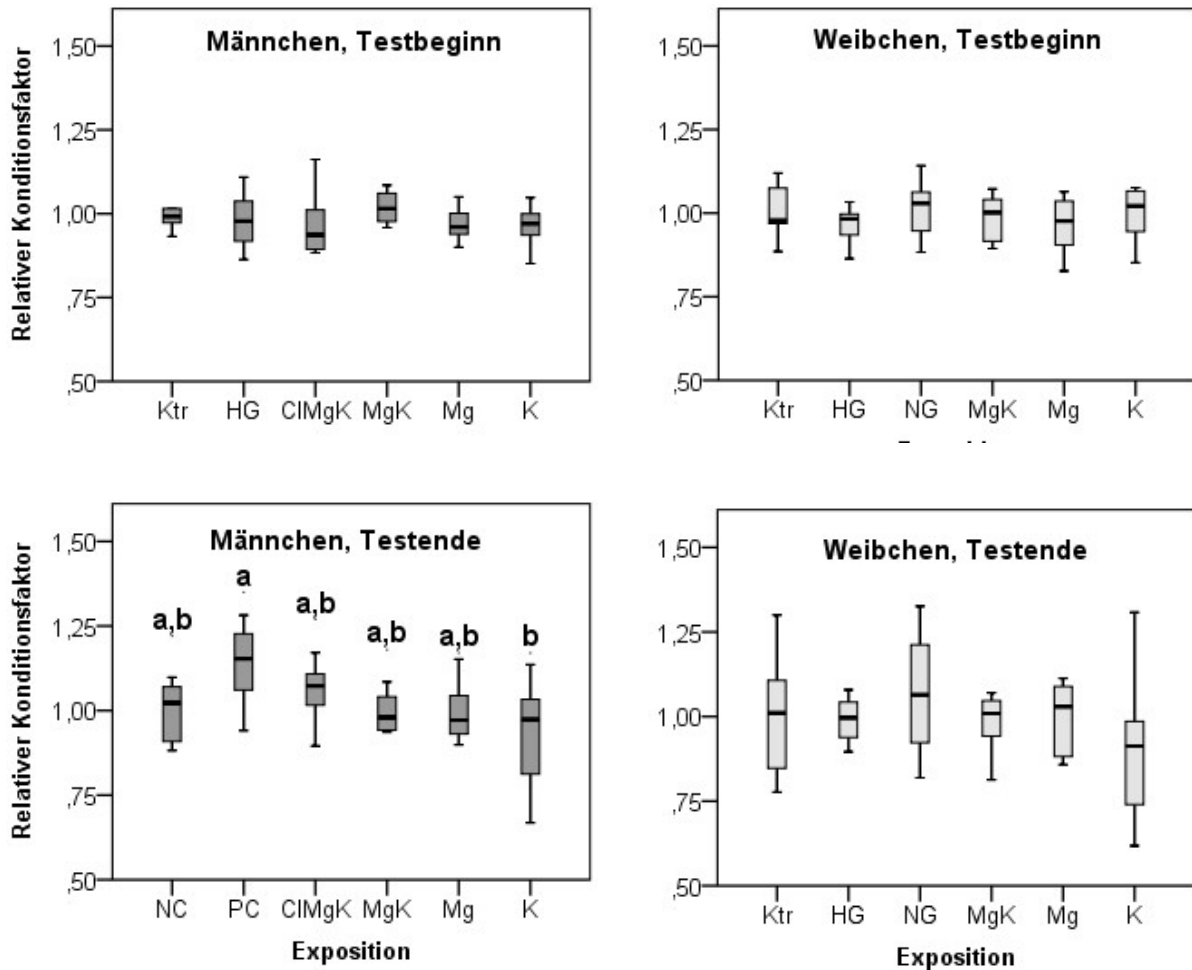


Abbildung 11: Relative Konditionsfaktoren der Versuchstiere am Beginn und am Ende des Tests. Männchen und Weibchen wurden getrennt erfasst. Mediane, Quartile und Extremwerte (dargestellt als Boxplot) wurden aus 5 Replikaten ($n = 10$) pro Expositionsgruppe errechnet.

Zu Beginn des Tests gab es keine signifikanten Unterschiede der RKF zwischen den Testgruppen (Männchen: $\chi^2(5) = 3,174$, $p = 0,673$; Weibchen: $\chi^2(5) = 7,807$, $p = 0,167$). Signifikante Effekte konnten bei den Weibchen auch am Ende des Tests nicht festgestellt werden ($\chi^2(5) = 4,386$, $p = 0,15$). Bei den Männchen führte die Salzexposition am Ende des Tests zu signifikanten Unterschieden ($\chi^2(5) = 13,905$, $p = 0,016$). Allerdings waren nur die Konditionsfaktoren der HG signifikant höher als die der K ($z = 3,079$, $p = 0,031$). Der Effekt war stark ($r = 0,726$). Eine Erhöhung der Spannweite der RKF-Werte, das heißt ein „Auseinanderwachsen“ der Tiere, am Ende des Tests im Vergleich zum Testbeginn konnte bei allen Testgruppen festgestellt werden und war in der K am deutlichsten (Abbildung 11).

3.1.2 Einfluss von Ionenungleichgewichten auf die Reproduktionsleistung

3.1.2.1 Eiqualität

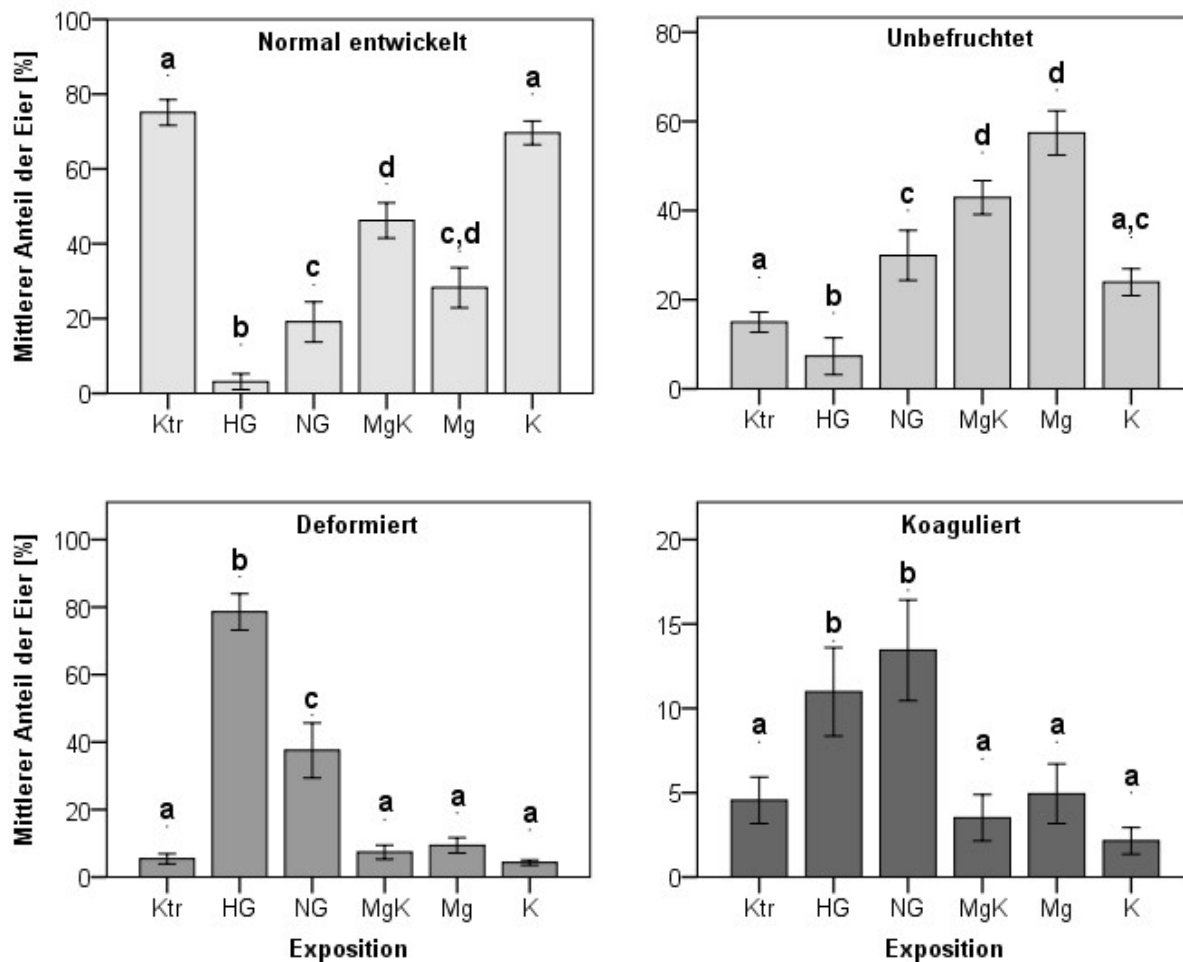


Abbildung 12: Mittlere Eiqualität über die Gesamtdauer des Tests. Die Eier wurden in vier Merkmalskategorien unterteilt: normal entwickelt, unbefruchtet, deformiert und koagulierte. Die Mittelwerte wurden aus 5 Replikaten (n = 720) pro Testgruppe errechnet. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm dargestellt.

Bei allen vier untersuchten Merkmalskategorien unterschieden sich die Eianzahlen der Expositionen und der Ktr signifikant: normal entwickelt ($\chi^2(5) = 269,282$, $p < 0,001$), unbefruchtet ($\chi^2(5) = 210,084$, $p < 0,001$), deformiert ($\chi^2(5) = 208,045$, $p < 0,001$) und koagulierte ($\chi^2(5) = 86,353$, $p < 0,001$).

Ergebnisse

Die Ktr und K wiesen von allen Testgruppen den höchsten Anteil an normal entwickelten Eiern auf (Abbildung 12). In der HG wurde von allen Testgruppen der kleinste Anteil normal entwickelter Eier festgestellt. Aus diesem Grund konnten ELST mit dieser Expositionsgruppe nicht durchgeführt werden.

Den signifikant höchsten Anteil koagulierter Eier wiesen die HG und NG auf. Außer bei HG waren koagulierte Eier bei allen Expositionen und auch bei der Ktr anteilig am seltensten vertreten (Abbildung 12, Tabelle 23).

Der Anteil deformierter Eier war am signifikant höchsten in der rHG, signifikant höher als in allen anderen Testgruppen. Die NG wies ebenfalls einen signifikant höheren Anteil deformierter Eier auf als die MgK, Mg und K. Die MgK, Mg und K unterschieden sich nicht signifikant.

Alle Expositionsgruppen außer der HG wiesen einen signifikant höheren Anteil unbefruchteter Eier auf als die Ktr. In der Mg und der MgK waren die meisten Eier unbefruchtet. Auch die Effekte waren in diesen Gruppen am größten (Abbildung 12, Tabelle 23). In der Summe waren die Anteile deformierter und koagulierter Eier in der HG und NG am höchsten (Abbildung 12).

Tabelle 203: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Qualitätsmerkmale: deformiert, koaguliert, normal entwickelt und unbefruchtet. (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)

		Mittelwert ± SD	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke
		Anteil Eier	Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
normal entwickelt	Ktr	75,1 ± 13,97										
	HG	3,1 ± 8,66	0,000	1,198								
	NG	19,1 ± 19,36	0,000	0,872	0,008	0,317						
	MgK	46,2 ± 16,31	0,000	0,456	0,000	0,668	0,001	0,371				
	Mg	28,3 ± 20,72	0,000	0,734	0,000	0,481	1,000	0,158	0,213	0,236		
	K	69,6 ± 11,79	1,000	0,103	0,000	1,130	0,000	0,808	0,001	0,377	0,000	0,658
unbefruchtet	Ktr	15,0 ± 9,12										
	HG	7,3 ± 17,04	0,016	0,283								
	NG	29,9 ± 20,21	0,005	0,332	0,000	0,612						
	MgK	42,9 ± 13,01	0,000	0,618	0,000	0,882	0,018	0,306				
	Mg	57,4 ± 19,31	0,000	0,852	0,000	1,138	0,000	0,513	0,911	0,180		
	K	23,9 ± 11,31	0,113	0,250	0,000	0,541	1,000	0,095	0,000	0,406	0,000	0,629
deformiert	Ktr	5,4 ± 6,15										
	HG	78,6 ± 22,30	0,000	0,985								
	NG	37,5 ± 29,38	0,000	0,683	0,019	0,295						
	MgK	7,4 ± 7,21	1,000	0,113	0,000	0,811	0,000	0,535				
	Mg	9,4 ± 8,75	0,136	0,236	0,000	0,763	0,000	0,462	1,000	0,111		
	K	4,3 ± 2,96	1,000	0,009	0,000	1,023	0,000	0,723	1,000	0,127	0,139	0,255
koaguliert	Ktr	4,5 ± 5,60										
	HG	11,0 ± 10,83	0,000	0,362								
	NG	13,4 ± 10,72	0,000	0,445	1,000	0,085						
	MgK	3,5 ± 4,73	1,000	0,117	0,000	0,456	0,000	0,540				
	Mg	4,9 ± 6,83	1,000	0,015	0,000	0,382	0,000	0,471	1,000	0,108		
	K	2,2 ± 2,95	0,083	0,260	0,000	0,632	0,000	0,727	1,000	0,125	0,162	0,250

3.1.2.2 Eigröße

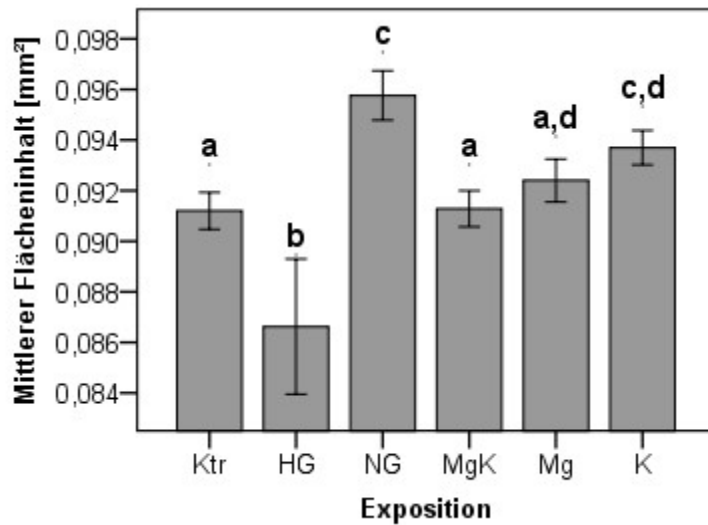


Abbildung 13: Mittlere Eigröße der Testgruppen über den Gesamttestzeitraum. Die Mittelwerte wurden aus 5 Replikaten ($n = 720$) pro Exposition errechnet. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm dargestellt.

Die Expositionen unterschieden sich signifikant bezüglich der Dottersackgröße ($\chi^2(5) = 91,768$, $p < 0,001$). In der HG war die mittlere Dottersackgröße signifikant kleiner als in den anderen Gruppen (Abbildung 13). Die NG und K wiesen signifikant größere Dottersäcke auf als die Ktr, HG und MgK (Tabelle 24).

Tabelle 24: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Eigrößen (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)

	Mittelwert \pm SD	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke
	Oberfläche [mm²]	Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
Ktr	0,091 \pm 0,0091										
HG	0,087 \pm 0,0120	0,017	0,125								
NG	0,096 \pm 0,0111	0,000	0,209	0,000	0,278						
MgK	0,091 \pm 0,0086	1,000	0,001	0,019	0,127	0,000	0,210				
Mg	0,092 \pm 0,0106	1,000	0,050	0,001	0,157	0,000	0,159	1,000	0,051		
K	0,094 \pm 0,0082	0,000	0,125	0,000	0,211	0,088	0,085	0,000	0,126	0,163	0,075

3.1.2.3 Laichfrequenz und Eianzahl

Die Eianzahl pro Laichereignis war bei allen Testgruppen sehr variabel (siehe Variationskoeffizient in Tabelle 25) und unterschied sich nicht signifikant ($\chi^2(5) = 3,777$, $p = 0,582$).

Tabelle 25: Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (VK) der Eianzahl pro Laichereignis sowie die Laichfrequenz als Anzahl der Laichereignisse während des gesamten Testzeitraumes

	Ktr	HG	LG	MgK	Mg	K
Mittelwert	226	234	244	357	256	256
SD	122	139	120	218	161	115
VK	53,95 %	59,35 %	49,06 %	61,14 %	62,91 %	44,65 %
Laichfrequenz	14	13	10	9	12	11

Allerdings unterschied sich die Laichfrequenz in Verbindung mit der Gelegegröße über den Beobachtungszeitraum signifikant ($\chi^2(5) = 548,564$, $p < 0,001$, Cox-Regression). Die Wahrscheinlichkeit eines Laichereignisses war für alle Expositionen niedriger als für die Ktr ($p < 0,001$). Die Hazardraten der Expositionen wiesen eine jeweils geringere Wahrscheinlichkeit für ein Laichereignis von 14,90 % für HG, 17,96 % für Mg, 14,28 % für NG, 15,95 % für K und 2,01 % für MgK auf. Es wurde ein signifikanter Effekt der Salzexpositionen auf die Laichfrequenz in Kombination mit der Gelegegröße über den gesamten Testzeitraum festgestellt (Abbildung 14).

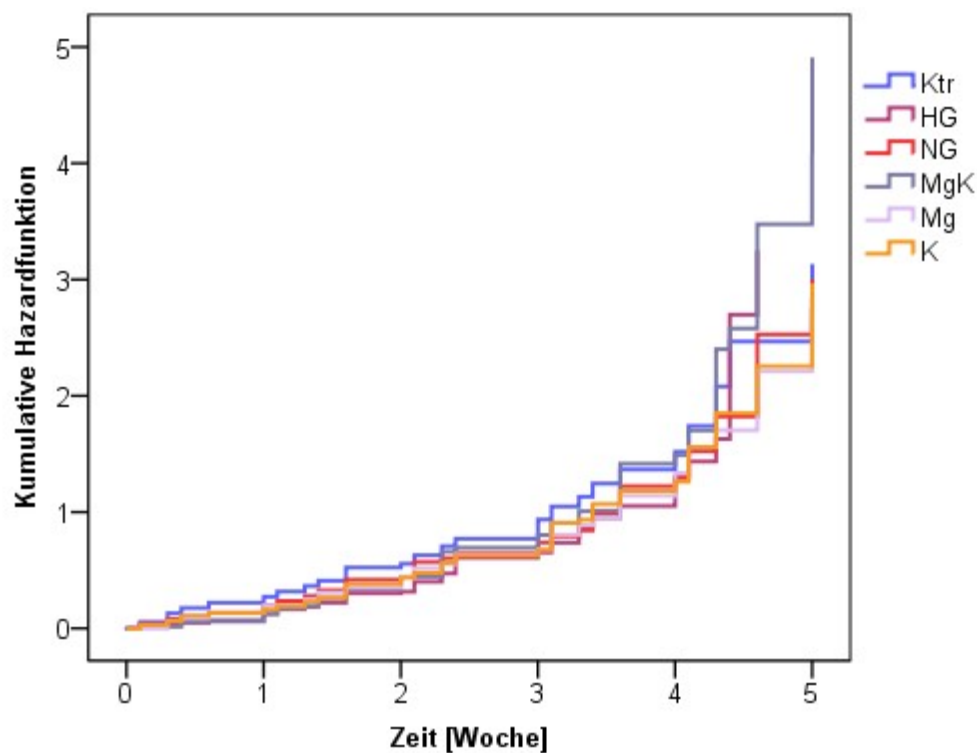


Abbildung 14: Kumulative Hazardrate als Wahrscheinlichkeit, dass ein Laichereignis zu einem bestimmten Zeitpunkt auftritt.

3.1.3 Einfluss von Ionenimbilanzen auf die F1-Generation

3.1.3.1 Schlupf

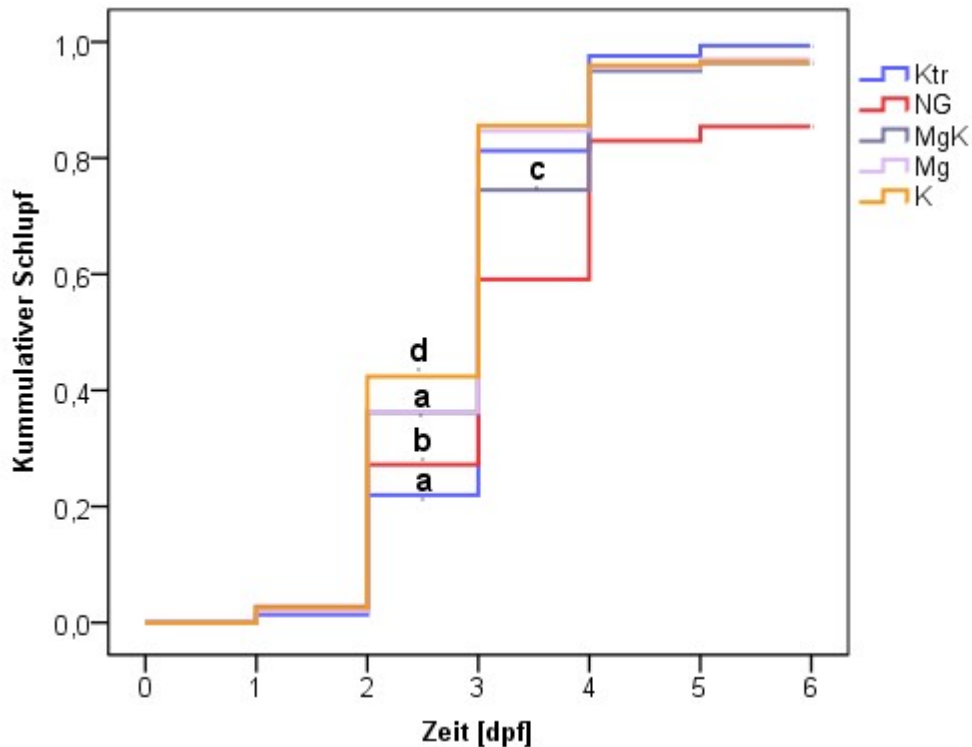


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve: Darstellung der Zeit bis zum Schlüpfen der Larven in dpf. Der kumulative, prozentuale Anteil der ungeschlüpften Larven wurde aus 5 Replikaten (n = 50 je Laichereignis) pro Exposition errechnet.

Die HG fehlt in der Abbildung und Analyse, denn aufgrund des hohen Anteils koagulierter Eier in dieser Exposition standen nicht genügend lebensfähige Embryonen für weitere Tests zur Verfügung. Das Schlupfverhalten der Larven in den Testgruppen unterschied sich hoch signifikant ($\chi^2(4) = 262,574$, $p < 0,001$). Außer der Mg unterschieden sich alle Salzexpositionen signifikant von der Ktr und auch untereinander (Tabelle 26).

Die Ktr erzielte im Beobachtungszeitraum von allen Expositionen die höchste Schlupfrate von 99,41 %, gefolgt von K = 97,12 %, MgK = 96,57 %, Mg = 96,50 % und der NG mit der niedrigsten Schlupfrate von 85,69 %. Bei allen Expositionen fanden die meisten Schlupfereignisse zwischen dem zweiten und dritten Tag pf statt (Abbildung 15). In der Ktr schlüpften in dieser Zeitspanne die meisten Larven: 59,29 %, bei HG = 31,90 %, MgK = 43,20 %, Mg = 38,33 % und 48,46 % bei der K. Außerdem wies die Ktr von allen Testgruppen die geringsten Anteile an verfrühtem Schlupf auf (bis 48 hpf). In der HG

schlüpften besonders ab dem dritten Tag deutlich weniger Larven als in den restlichen Expositionen (Abbildung 15).

Tabelle 26: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Schlupfwahrscheinlichkeit (Chi-Quadrat-Wert und Signifikanzniveau)

	χ^2	Sig.	χ^2	Sig.	χ^2	Sig.	χ^2	Sig.
	Ktr		NG		MgK		Mg	
NG	136,522	0,000						
MgK	69,514	0,000	165,315	0,000				
Mg	0,033	0,855	74,698	0,000	27,865	0,000		
K	35,842	0,000	158,150	0,000	6,438	0,011	13,015	0,000

3.1.3.2 Mortalität

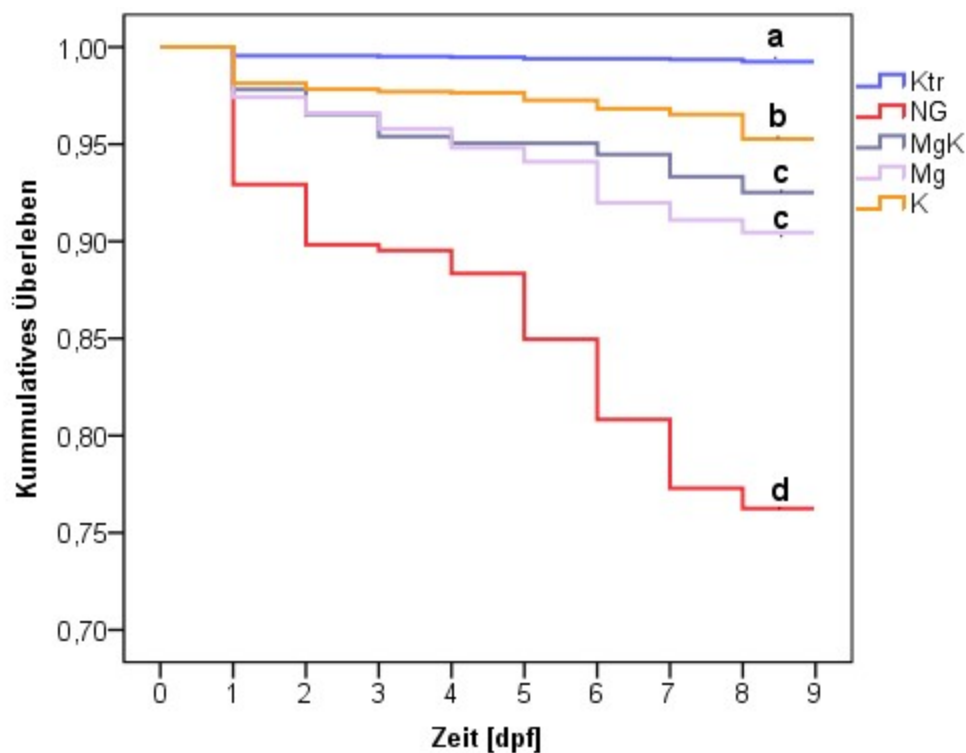


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve: Darstellung der Zeit bis zum Sterben der Larven in dpf. Der kumulative, prozentuale Anteil der lebenden Larven wurde aus 5 Replikaten ($n = 50$ je Laichereignis) pro Exposition errechnet.

Die Mortalitätsraten der Embryonen und Larven wurden bis zum achten dpf kontrolliert. Aufgrund von zu wenigen normal entwickelten Embryonen in der HG konnten mit den Nachkommen dieser Exposition keine weiteren Tests durchgeführt werden (Abbildung 16). Alle Salzexpositionen wiesen ein hoch signifikant höheres Sterberisiko auf als die Ktr

(Tabelle 27). Die Verteilung der Mortalitätsraten unterschied sich bei allen Expositionen signifikant ($\chi^2(4) = 536,077$, $p < 0,001$). Während die Larven der HG-Exposition die höchsten Sterberaten aufwiesen (23,7 %), waren sie in der Ktr am niedrigsten (0,8 %). Die Sterberaten von Mg mit 9,5 %, MgK mit 7,5 % und K mit 4,7 % befindet sich, bezüglich der Größenordnung, zwischen der Ktr und der NG (Abbildung 16).

Tabelle 27: Mehrfachvergleiche der Expositionsguppen für die Überlebenswahrscheinlichkeit (Chi-Quadrat-Wert und Signifikanzniveau)

	χ^2	Sig.	χ^2	Sig.	χ^2	Sig.	χ^2	Sig.
	Ktr		NG		MgK		Mg	
NG	392,706	0,000						
MgK	139,425	0,000	56,915	0,000				
Mg	167,648	0,000	32,452	0,000	1,822	0,177		
K	78,837	0,000	122,070	0,000	10,171	0,001	19,535	0,000

3.1.3.3 Deformationen

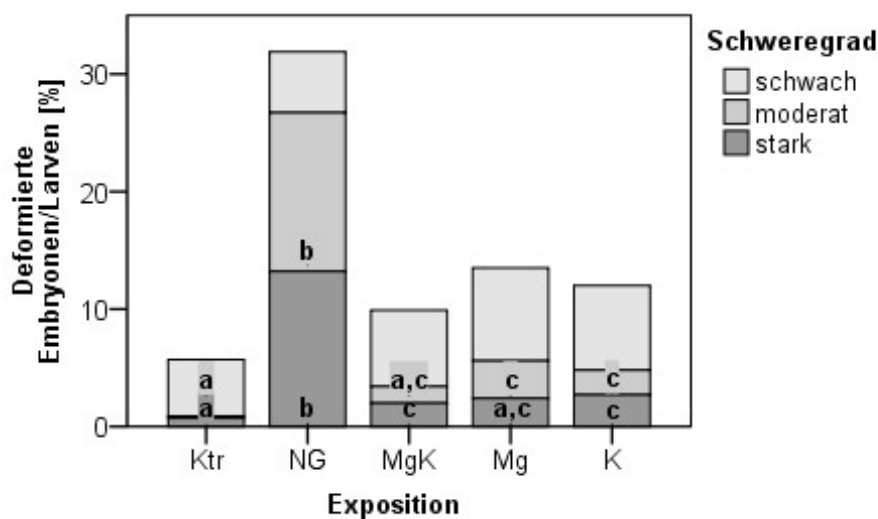


Abbildung 17: Mittlerer prozentualer Anteil der deformierten Larven nach Schweregraden. Der prozentuale Anteil der deformierten Larven wurde aus 5 Replikaten ($n = 50$ Embryonen je Laichereignis) pro Exposition über den gesamten Versuchszeitraum errechnet. Die deformierten Larven sind nach Schweregraden unterteilt in: schwach = eine Deformation, moderat = zwei Deformationen und schwer = drei Deformationen.

Die Embryonen und Larven wurden während des gesamten Testzeitraumes auf das Auftreten von Deformationen überprüft. Die Ktr wies mit 5,46 % die geringste und die NG mit 32,13 % die deutlich höchste Deformationsrate auf. Relativ nah beieinander lagen die Deformationsraten der MgK mit 13,60 %, der Mg mit 11,96 % und der K mit 9,89 %. Die mittlere Anzahl

von schwach deformierten Larven unterschied sich nicht signifikant. Der Anteil moderat und stark deformierter Larven unterschied sich dagegen signifikant zwischen den Testgruppen (moderat: $\chi^2(4) = 46,171$, $p < 0,001$; stark: $\chi^2(4) \chi^2(5) = 41,195$, $p < 0,001$). In der Ktr waren die wenigsten Larven moderat und/oder stark deformiert (Abbildung 17). Die NG wies den signifikant höchsten Anteil an moderat und stark deformierten Larven auf. Hier zeigten sich die stärksten Effekte (Tabelle 28). Der Anteil an stark deformierten Larven war bei der MgK und K höher als bei der Ktr. Die Effekte waren moderat bis schwach. Die Expositionen MgK, Mg und K unterschieden sich nicht signifikant (Tabelle 28).

Tabelle 28: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Deformationsrate (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)

		Mittelwert \pm SD		p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke
		Deformationsrate		Ktr		NG		MgK		Mg	
moderat	Ktr	0,3 %	\pm 0,67 %								
	NG	13,5 %	\pm 14,76 %	0,000	0,700						
	MgK	1,4 %	\pm 2,56 %	0,197	0,195	0,000	0,504				
	Mg	3,2 %	\pm 5,54 %	0,014	0,291	0,004	0,447	1,000	0,097		
	K	2,1 %	\pm 4,21 %	0,047	0,265	0,000	0,631	1,000	0,021	1,000	0,099
stark	Ktr	0,6 %	\pm 2,98 %								
	NG	13,2 %	\pm 12,63 %	0,000	0,660						
	MgK	2,0 %	\pm 3,17 %	0,018	0,261	0,002	0,406				
	Mg	2,4 %	\pm 4,29 %	0,353	0,191	0,001	0,507	1,000	0,057		
	K	2,7 %	\pm 4,37 %	0,023	0,285	0,000	0,563	1,000	0,036	1,000	0,035

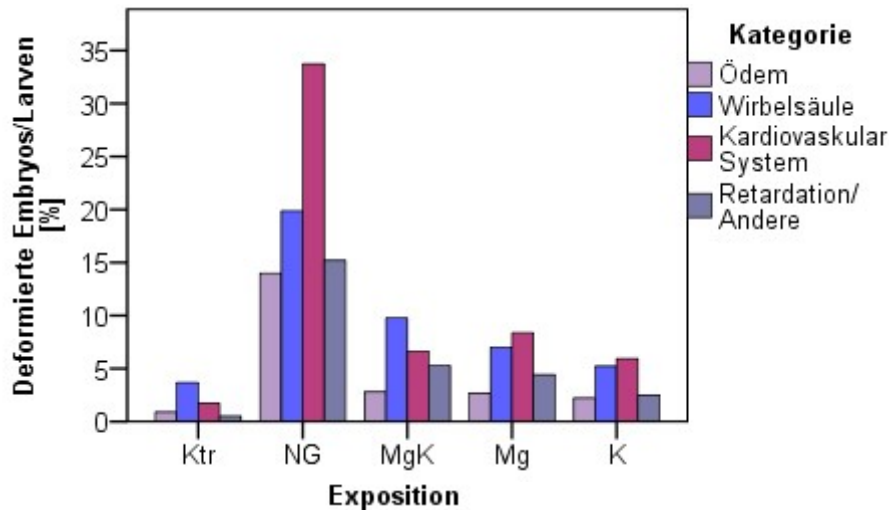


Abbildung 18: Mittlerer prozentualer Anteil der deformierten Larven nach Symptomen. Der prozentuale Anteil der deformierten Larven wurde aus 5 Replikaten (n = 50 Embryonen je Laichereignis) pro Exposition über den gesamten Versuchszeitraum errechnet. Die deformierten Larven sind nach Symptomen unterteilt in: Ödeme, Wirbelsäulendeformationen, Störungen des Herz-Kreislauf-Systems und Deformationen/Retardationen.

Neben den Schweregraden wurden die Deformationen nach Symptomen in vier verschiedene Kategorien eingeteilt (Abbildung 18). In allen Expositionen und der Ktr waren die Deformationen des Herz-Kreislauf-Systems (Ktr: 1,79 %, NG: 33,73 %, MgK: 6,64 %, Mg: 8,38 %, K: 5,94 %) und der Wirbelsäule (Ktr: 3,11 %, NG: 19,87 %, MgK: 9,76 %, Mg: 7,00 %, K: 5,22 %) am häufigsten. Retardationen (Ktr: 0,46 %, NG: 15,20 %, MgK: 5,28 %, Mg: 4,42 %, K: 2,50 %) und Ödeme (Ktr: 0,89 %, NG: 14,00 %, MgK: 2,80 %, Mg: 2,69 %, K: 2,22 %) waren in Summe am seltensten vertreten – sowohl in den Expositionen als auch in der Ktr (Abbildung 18).

3.2 Early Life Stage Test (ELST)

3.2.1 Schlupf

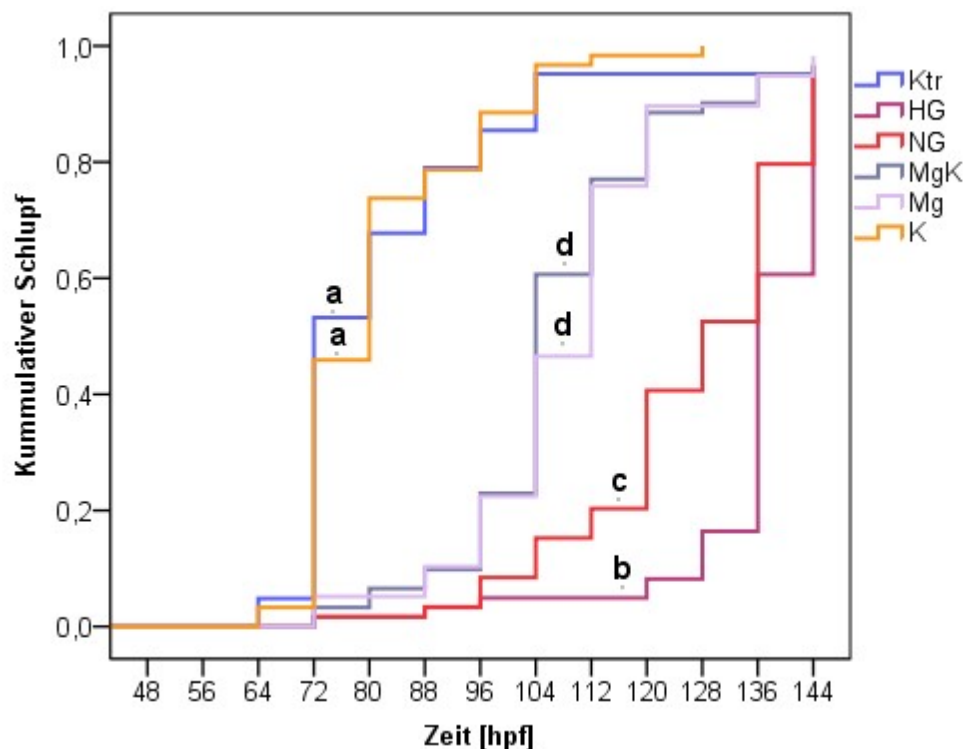


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurve: Darstellung der Zeit bis zum Schlüpfen der Larven in hpf. Der prozentuale Anteil der ungeschlüpfen Larven wurde aus 3 Replikaten (n = 63) pro Exposition errechnet.

Für die Bestimmung der Schlupfraten wurde alle acht Stunden überprüft, ob die Larven geschlüpft waren. Die Verteilung der Schlupfraten unterschied sich signifikant ($\chi^2(5) = 273,694$, $p > 0,001$). Paarweise Vergleiche zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Schlupfwahrscheinlichkeiten der Testgruppen, außer zwischen Ktr und K sowie MgK und Mg (Tabelle 29). Die Larven aller Expositionen außer K schlüpften signifikant später als die Ktr. In der HG und in geringerem Maße in der NG zeigten die Larven deutlich verspäteten Schlupf (Abbildung 19). Die meisten Larven in der K und in der Ktr schlüpften zwischen 64 und 72 hpf, in MgK und Mg zwischen 96 und 112 hpf und die Larven in der NG und HG sogar noch später.

Tabelle 29: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Schlupfwahrscheinlichkeit (Chi-Quadrat-Wert und Signifikanzniveau)

	χ^2	Sig.	χ^2	Sig.	χ^2	Sig.	χ^2	Sig.	χ^2	Sig.
	Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
HG	78,616	0,000								
NG	60,482	0,000	12,011	0,001						
MgK	37,949	0,000	62,195	0,000	27,555	0,000				
Mg	38,290	0,000	63,382	0,000	27,217	0,000	0,200	0,655		
K	0,183	0,669	128,310	0,000	107,651	0,000	64,314	0,000	66,400	0,000

3.2.2 Mortalität

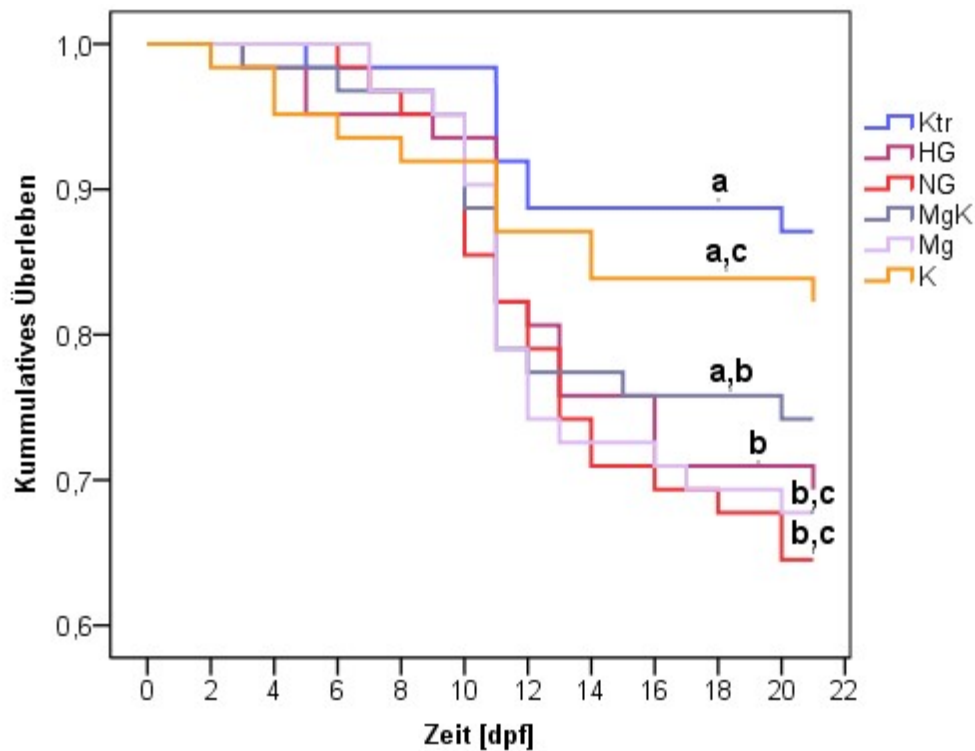


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurve: Darstellung der Zeit bis zum Sterben der Larven in dpf. Der kumulative, prozentuale Anteil der lebenden Larven wurde aus 3 Replikaten ($n = 63$) pro Exposition errechnet.

Für die Sterberate wurde täglich die Anzahl der toten Embryonen ermittelt. Das Fehlen von Herzschlag und Blutkreislauf waren hierfür wichtigstes Kriterium. Die Ktr erzielte im Beobachtungszeitraum die niedrigste Sterberate (13,11 %, Abbildung 20). Es folgt die K mit 18,03 %, die MgK mit 26,23 %, die HG mit 31,15 %, die Mg mit 32,79 % und schließlich die NG mit der höchsten Sterberate von 36,07 %. Die Testgruppen unterschieden sich signifikant voneinander ($\chi^2(5) = 11,871$, $p = 0,037$). Die Vergleiche mit der Ktr zeigten signifikant höhere Sterbewahrscheinlichkeiten für HG, Mg und NG. Die Salzexpositionen unterschieden sich, mit

Ausnahme der HG und K, nicht voneinander (Tabelle 30). Die Sterbekurven verlaufen nicht gleichmäßig und das Sterberisiko der Expositionen variiert zeitlich stark. Mit Ausnahme der NG, welche die höchsten Sterberaten zwischen dem 8. und 9. Tag verzeichnete, wiesen alle Salzexpositionen inklusive der Ktr zwischen dem 11. und 12. Tag die höchsten Verluste auf (Abbildung 20).

Tabelle 30: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Sterbewahrscheinlichkeit (Chi-Quadrat-Wert und Signifikanzniveau)

	χ^2	Sig.	χ^2	Sig.	χ^2	Sig.	χ^2	Sig.	χ^2	Sig.
	Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
HG	14,554	0,000								
NG	5,657	0,017	2,185	0,139						
MgK	3,565	0,059	3,693	0,055	0,217	0,641				
Mg	6,768	0,009	1,360	0,243	0,061	0,804	0,479	0,489		
K	0,637	0,425	9,423	0,002	2,462	0,117	1,084	0,298	3,108	0,078

3.2.3 Deformationen

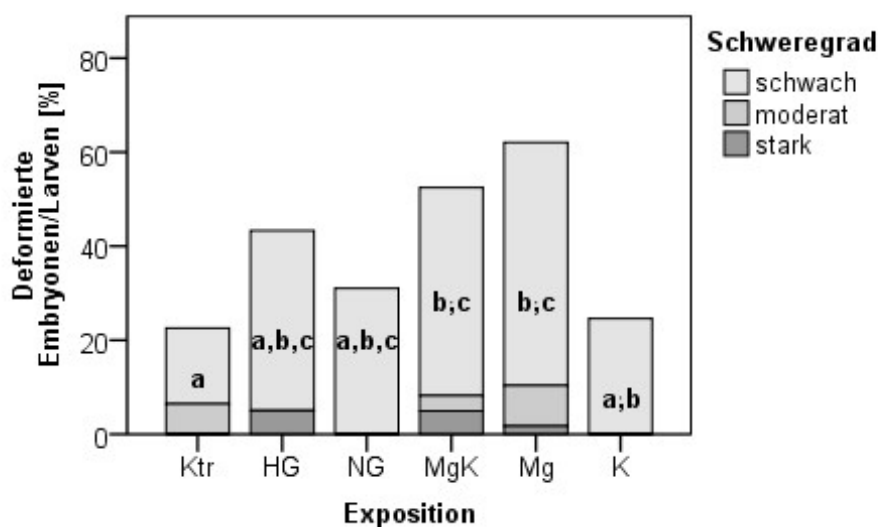


Abbildung 21: Mittlerer prozentualer Anteil der deformierten Larven nach Schweregraden. Der prozentuale Anteil der deformierten Larven wurde aus 3 Replikaten ($n = 63$) pro Exposition über den gesamten Versuchszeitraum errechnet. Die deformierten Larven sind nach Schweregraden unterteilt in: schwach = eine Deformation, moderat = zwei Deformationen und schwer = drei Deformationen.

In dem ELST wies die Ktr mit 22,58 % gefolgt von der K-Gruppe mit 24,59 % und der NG mit 31,03 % die geringsten Deformationsraten auf (Abbildung 21). Die höchsten Deformationsraten wurden in der Mg mit 62,07 %, der MgK mit 52,46 % und der HG mit 43,33 % ermittelt. Der Anteil der stark deformierten Embryonen und Larven unterschied sich

nicht signifikant zwischen den Testgruppen. Zwischen den moderat deformierten Larven gab es zwar statistisch signifikante Unterschiede ($\chi^2(5) = 14,091$, $p = 0,015$). In Mehrfachvergleichen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testgruppen festgestellt werden. Die Anzahl der schwachen Deformationen unterschied sich ebenfalls signifikant zwischen den Testgruppen ($\chi^2(5) = 22,821$, $p < 0,001$). Hier wiesen die Expositionen Mg und MgK signifikant mehr schwach deformierte Larven/Embryonen auf als die Ktr (Abbildung 21, Tabelle 31). In der Mg wurden signifikant mehr schwach deformierte Larven festgestellt als in der K. Die Effekte waren schwach bis moderat (Tabelle 31).

Tabelle 31: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Deformationsrate (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)

	Mittelwert \pm SD	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke
	Deformationsrate	Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
schwach	Ktr	15,9 % \pm 5,50 %									
	HG	36,5 % \pm 16,72 %	0,147	0,230							
	NG	28,6 % \pm 12,60 %	1,000	0,153	1,000	0,074					
	MgK	42,9 % \pm 4,76 %	0,015	0,293	1,000	0,061	1,000	0,135			
	Mg	47,6 % \pm 12,60 %	0,001	0,366	1,000	0,136	0,285	0,209	1,000	0,076	
	K	23,8 % \pm 9,52 %	1,000	0,088	1,000	0,142	1,000	0,066	0,332	0,204	0,028 0,278
moderate	Ktr	6,3 % \pm 2,75 %									
	HG	0,0 % \pm 0,00 %	0,581	0,184							
	NG	0,0 % \pm 0,00 %	0,607	0,183	1,000	0,000					
	MgK	3,2 % \pm 2,75 %	1,000	0,091	1,000	0,093	1,000	0,092			
	Mg	7,9 % \pm 9,91 %	1,000	0,061	0,099	0,242	0,106	0,240	1,000	0,151	
	K	0,0 % \pm 0,00 %	0,569	0,185	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,094	0,096 0,243

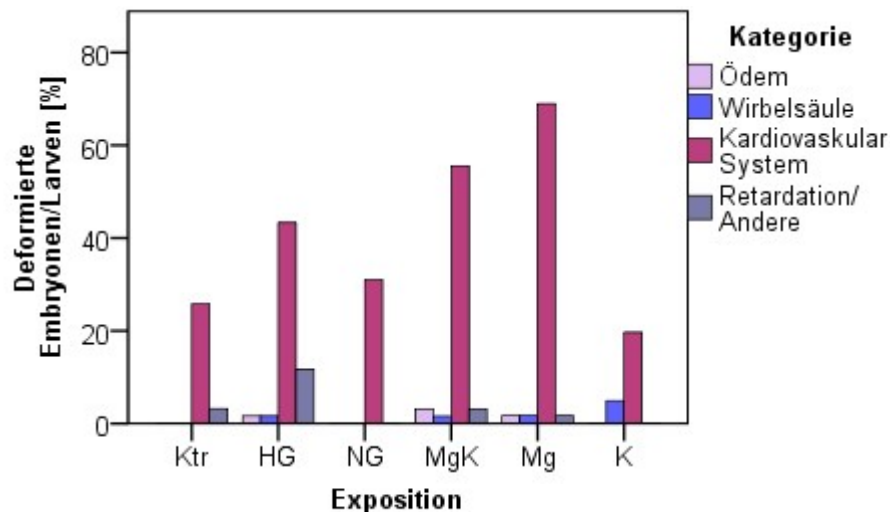


Abbildung 22: Mittlerer prozentualer Anteil der deformierten Larven nach Symptomen. Der prozentuale Anteil der deformierten Larven wurde aus 5 Replikaten ($n = 63$ Embryonen je Laichereignis) pro Exposition über den gesamten Versuchszeitraum errechnet. Die deformierten Larven sind nach Symptomen unterteilt in: Ödeme, Wirbelsäulendeformationen, Störungen des Herz-Kreislauf-Systems und Deformationen/Retardationen.

Von allen untersuchten Symptomen waren Störungen des Herz-Kreislauf-Systems am häufigsten und in allen Testgruppen die häufigste Deformationskategorie (Ktr: 25,81 %, HG: 43,33 %, NG: 31,03 %, MgK: 55,5 %, Mg: 68,97 %, K: 19,7 %). Die HG wies den höchsten Anteil an retardierten Embryonen/Larven auf (Ktr: 3,23 %, HG: 11,67 %, NG: 0,00 %, MgK: 3,17 %, Mg: 1,72 %, K: 0,00 %). Die meisten Ödeme entstanden bei Larven der Mg (Ktr: 0,00 %, HG: 1,48 %, NG: 0,00 %, MgK: 5,26 %, Mg: 1,72 %, K: 0,00 %), während in der K die meisten Larven mit Wirbelsäulendeformationen festgestellt wurden (Ktr: 0,00 %, HG: 1,67 %, NG: 0,00 %, MgK: 1,56 %, Mg: 1,72 %, K: 4,92 %) (Abbildung 22).

3.2.4 Herzfrequenz

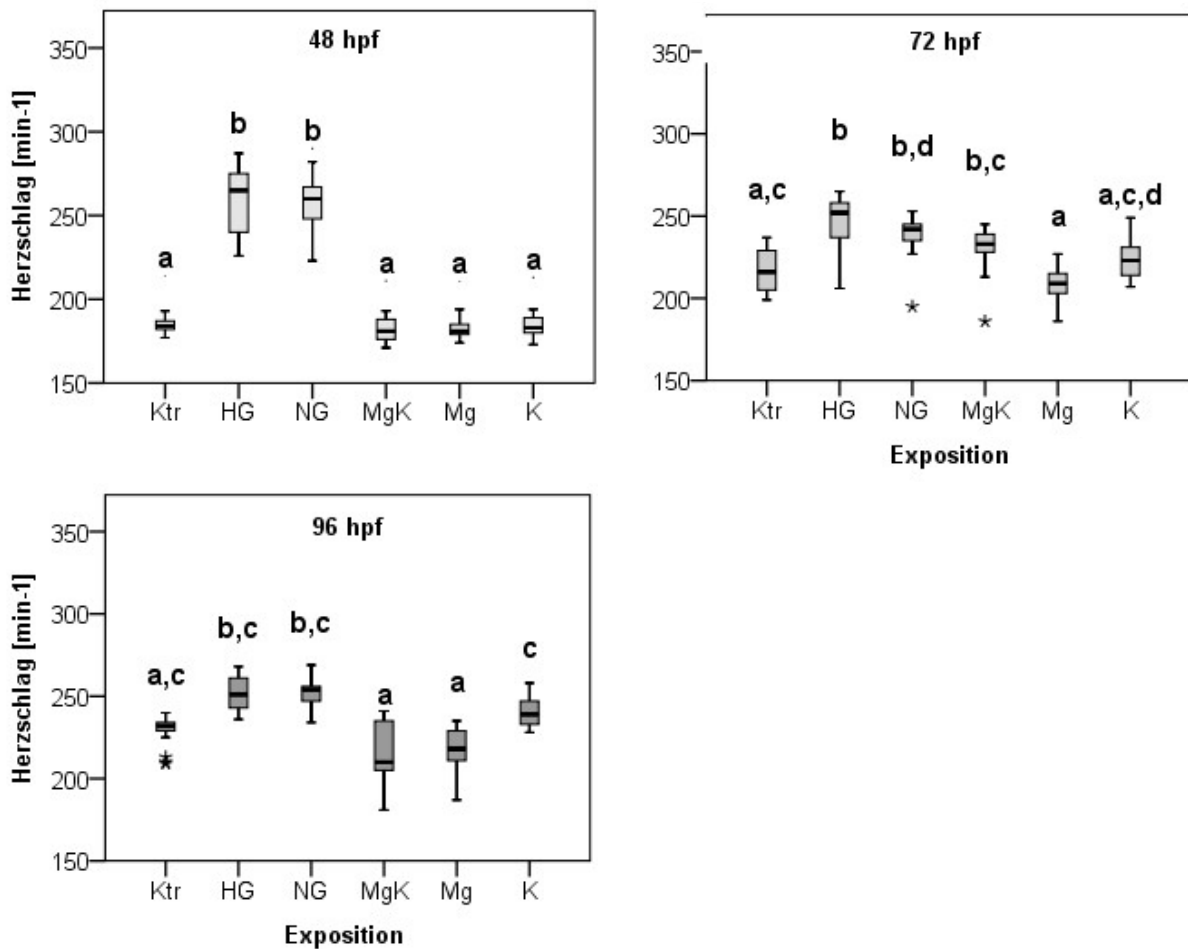


Abbildung 23: Mittlere Herzfrequenz der Embryonen im Alter von 48, 72 und 96 hpf. Mediane, Quartile und Extremwerte (dargestellt als Boxplot) wurden aus 3 Replikaten ($n = 63$) pro Exposition errechnet.

Die Herzschlagraten der Embryonen unterschieden sich an allen drei untersuchten Zeitpunkten (48 h: $\chi^2(5) = 86,901$, $p < 0,001$, 72 h: $\chi^2(5) = 52,665$, $p < 0,001$, 96 h: $\chi^2(5) = 78,661$, $p < 0,001$). Die Embryonen der HG und NG wiesen an allen drei Zeitpunkten signifikant höhere Herzschlagraten auf als die Embryonen der Ktr (Abbildung 23). Die mittleren Herzschlagraten der HG und NG waren zwar höher als in der MgK, Mg und K. Die Unterschiede waren allerdings nicht immer statistisch signifikant (Tabelle 32). Die MgK, Mg und K wiesen zum Teil höhere und zum Teil niedrigere Herzschlagraten als die Ktr auf. Sie unterschieden sich allerdings nicht signifikant. Außerdem wurden teilweise signifikante Unterschiede zwischen der MgK, Mg und K festgestellt. Die Effekte waren moderat (Tabelle 32).

Tabelle 32: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Herzfrequenz (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)

		Mittelwert \pm SD		p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke
		Herzschläge/min		Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
48 hpf	Ktr	185	\pm 5,4										
	HG	258	\pm 19,8	0,000	0,730								
	NG	257	\pm 16,0	0,000	0,719	1,000	0,011						
	MgK	182	\pm 10,1	1,000	0,214	0,000	0,943	0,000	0,933				
	Mg	181	\pm 5,8	1,000	0,220	0,000	0,950	0,000	0,939	1,000	0,006		
	K	185	\pm 5,8	1,000	0,042	0,000	0,772	0,000	0,761	1,000	0,171	1,000	0,178
72 hpf	Ktr	217	\pm 12,8										
	HG	239	\pm 34,0	0,000	0,660								
	NG	238	\pm 12,6	0,002	0,578	1,000	0,082						
	MgK	231	\pm 16,0	0,144	0,390	1,000	0,270	1,000	0,188				
	Mg	205	\pm 19,1	1,000	0,228	0,000	0,888	0,000	0,806	0,001	0,618		
	K	223	\pm 11,0	1,000	0,138	0,008	0,522	0,053	0,440	1,000	0,252	0,228	0,366
96 hpf	Ktr	229	\pm 9,3										
	HG	252	\pm 9,8	0,000	0,692								
	NG	251	\pm 9,5	0,000	0,666	1,000	0,026						
	MgK	215	\pm 17,8	1,000	0,246	0,000	0,938	0,000	0,912				
	Mg	219	\pm 12,1	1,000	0,232	0,000	0,924	0,000	0,898	1,000	0,014		
	K	239	\pm 14,0	0,722	0,298	0,135	0,394	0,220	0,368	0,005	0,544	0,007	0,530

3.2.5 Mineralgehalt

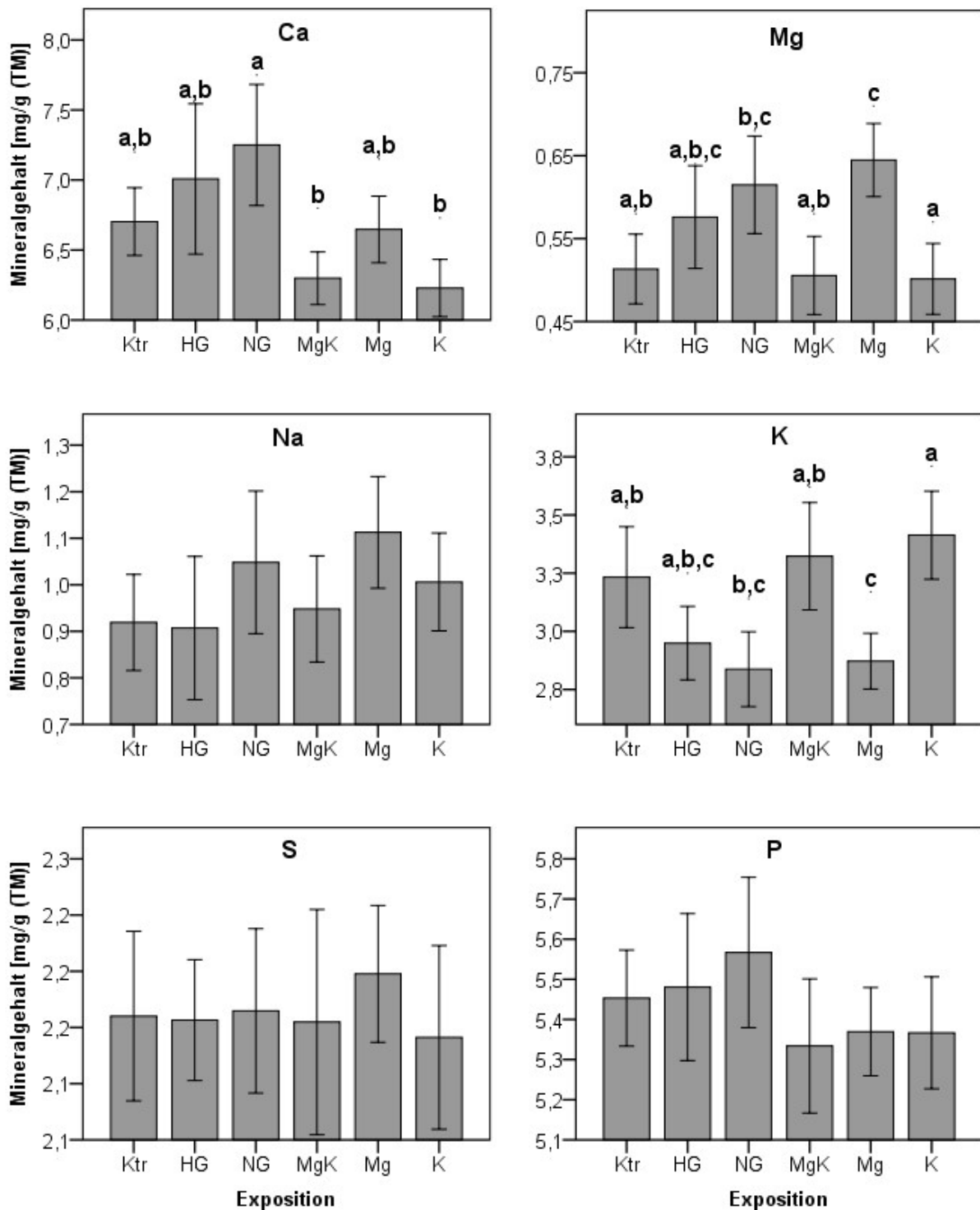


Abbildung 24: Mineralgehalte der Fischlarven in mg/g Trockenmasse der ganzen Fische. Die Mittelwerte wurden aus 3 Replikaten (n = 63) pro Exposition errechnet. Die Streuung der Daten ist als 95 %-Konfidenzintervall im Säulendiagramm dargestellt.

Die untersuchten Mineralien Ca, Mg, Na und K waren Hauptkomponenten der Salzkombinationen in den Expositionswässern. Von den Mineralien P und S war nur S in Form von Sulfatsalzen in der Mg und in der K in erhöhter Konzentration vorhanden. Die mittleren

Mineraliengehalte der Larven wiesen signifikante Unterschiede für Ca ($\chi^2(5) = 21,575$, $p = 0,001$), Mg ($\chi^2(5) = 29,105$, $p < 0,001$) und Na ($\chi^2(5) = 31,708$, $p < 0,001$) auf. Die P-, S- und Na-Gehalte der Larven unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 24).

Die K wies den höchsten K^+ -Gehalt auf – signifikant höher als bei HG, NG und Mg (Tabelle 33). Bei den Larven der MgK wurden ebenfalls signifikant höhere K^+ -Gehalte als bei der NG und Mg ermittelt. Die Larven der NG wiesen signifikant höhere Ca^{2+} -Gehalte auf als die MgK und K. Der Mg^{2+} -Gehalt der Larven der Mg war signifikant höher als bei der Ktr, der MgK und der K. Auch bei der NG konnten signifikant höhere Mg^{2+} -Gehalte als bei der K ermittelt werden. Die Effekte waren stark (Tabelle 33).

Tabelle33: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Mineraliengehalte (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)

		Mittelwert \pm SD	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke	p- Wert	Effekt- stärke
		mg/g TS	Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
Ca	Ktr	6,70 \pm 0,546										
	HG	7,01 \pm 1,044	1,000	0,075								
	NG	7,25 \pm 0,870	1,000	0,271	1,000	0,196						
	MgK	6,30 \pm 0,339	0,520	0,347	0,231	0,428	0,005	0,623				
	Mg	6,65 \pm 0,549	1,000	0,063	1,000	0,137	0,002	0,600	1,000	0,031		
	K	6,23 \pm 0,385	0,272	0,383	0,116	0,464	0,500	0,365	1,000	0,315	0,683	0,320
K	Ktr	0,51 \pm 0,095										
	HG	0,58 \pm 0,121	0,710	0,318								
	NG	0,61 \pm 0,118	0,060	0,455	1,000	0,138						
	MgK	0,51 \pm 0,085	1,000	0,132	0,153	0,454	0,010	0,590				
	Mg	0,64 \pm 0,102	0,054	0,434	1,000	0,113	1,000	0,023	0,009	0,556		
	K	0,50 \pm 0,080	1,000	0,216	0,029	0,539	0,001	0,676	1,000	0,084	0,001	0,643
Mg	Ktr	3,23 \pm 0,490										
	HG	2,95 \pm 0,307	1,000	0,284								
	NG	2,84 \pm 0,323	0,063	0,453	1,000	0,169						
	MgK	3,32 \pm 0,416	1,000	0,023	1,000	0,308	0,093	0,476				
	Mg	2,87 \pm 0,277	0,002	0,563	1,000	0,274	1,000	0,107	0,006	0,572		
	K	3,41 \pm 0,355	1,000	0,091	0,451	0,378	0,022	0,546	1,000	0,069	0,001	0,644

Neben den Mineraliengehalten wurden ebenfalls Effekte der Salzexpositionen auf einige Mineralienverhältnisse nachgewiesen (Tabelle 34). Von allen getesteten Mineralverhältnissen wurden bei den Verhältnissen Ca:Mg ($\chi^2(5) = 14,620$, $p = 0,012$), K:Mg ($\chi^2(5) = 44,400$, $p = p < 0,001$) und K:Na ($\chi^2(5) = 19,054$, $p = 0,002$) signifikante Unterschiede festgestellt.

Ergebnisse

Bei den Larven der Mg waren das Ca:Mg-, das K:Mg- und das K:Na-Verhältnis im Vergleich zur Ktr signifikant höher (Tabelle 34). Das K:Na-Verhältnis war in der Mg ebenfalls signifikant höher als bei der MgK. Die Larven der K wiesen ein signifikant niedrigeres K:Mg-Verhältnis auf als die Larven der HG, NG und Mg. Das Ca:P-Verhältnis war bei der K allerdings signifikant höher als bei der HG und NG. Die Larven der MgK wiesen ein signifikant niedrigeres K:Mg-Verhältnis auf als die NG und Mg. Die Effekte waren moderat bis stark.

Tabelle 214: Mehrfachvergleiche der Expositionsgruppen für die Mineralienverhältnisse (Signifikanzniveau und Effektstärke r), Mittelwert und Standardabweichung (SD)

		Mittelwert ± SD	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke	p-Wert	Effektstärke
		Mineralverhältnis	Ktr		HG		NG		MgK		Mg	
Ca:Mg	Ktr	0,28 ^a ± 0,052										
	HG	0,31 ^{a,b} ± 0,117	1,000	0,206								
	NG	0,37 ^{a,b} ± 0,112	1,000	0,217	1,000	0,010						
	MgK	0,28 ^{a,b} ± 0,036	1,000	0,117	1,000	0,088	1,000	0,098				
	Mg	0,39 ^b ± 0,114	0,007	0,522	0,737	0,311	0,794	0,302	0,228	0,394		
	K	0,29 ^{a,b} ± 0,040	1,000	0,066	1,000	0,140	1,000	0,150	1,000	0,052	0,077	0,448
K:Mg	Ktr	0,16 ^{a,b} ± 0,039										
	HG	0,20 ^b ± 0,055	0,457	0,347								
	NG	0,22 ^{b,c} ± 0,054	0,009	0,543	1,000	0,197						
	MgK	0,16 ^{a,b} ± 0,031	1,000	0,074	0,246	0,424	0,006	0,619				
	Mg	0,23 ^c ± 0,049	0,000	0,647	0,939	0,294	1,000	0,100	0,000	0,707		
	K	0,15 ^a ± 0,027	1,000	0,164	0,046	0,515	0,001	0,711	1,000	0,090	0,000	0,800
K:Na	Ktr	0,08 ^a ± 0,018										
	HG	0,09 ^{a,b} ± 0,027	1,000	0,061								
	NG	0,09 ^{a,b} ± 0,023	0,183	0,396	0,696	0,337						
	MgK	0,08 ^{a,b} ± 0,016	1,000	0,001	1,000	0,062	0,336	0,397				
	Mg	0,10 ^b ± 0,016	0,012	0,499	0,092	0,433	1,000	0,100	0,039	0,489		
	K	0,08 ^{a,b} ± 0,012	1,000	0,090	1,000	0,029	1,000	0,307	1,000	0,092	0,181	0,402
Ca:P	Ktr	0,82 ^{a,b} ± 0,055										
	HG	0,79 ^{a,b} ± 0,077	1,000	0,150								
	NG	0,77 ^a ± 0,065	0,805	0,330	1,000	0,169						
	MgK	0,85 ^b ± 0,043	1,000	0,306	0,194	0,435	0,008	0,614				
	Mg	0,81 ^{a,b} ± 0,048	1,000	0,099	1,000	0,062	1,000	0,251	0,312	0,417		
	K	0,86 ^b ± 0,046	0,290	0,406	0,037	0,534	0,001	0,721	1,000	0,087	0,058	0,526

3.2.6 Masse, Länge und Relativer Konditionsfaktor (RKF)

Die Körperlänge der juvenilen Fische unterschied sich signifikant zwischen den Testgruppen ($\chi^2(5) = 14,600$, $p = 0,012$). Die Larven der Mg wiesen das geringste Körperlängenwachstum auf (Tabelle 35). Sie waren signifikant kleiner als die Larven der Ktr ($z = -2,571$, $p = 0,050$; $r = 0,268$) und der K ($z = 3,019$, $p = 0,380$; $r = 0,318$). Zwischen den Testgruppen gab es keine Unterschiede bezüglich der Körpermasse ($\chi^2(5) = 4,899$, $p = 0,428$) und der RKF ($\chi^2(5) = 9,814$, $p = 0,81$).

Tabelle 35: Mittelwerte und Standardabweichung der Längen, Massen und RKF

	Länge [mm]	Masse [mg]	RKF
	Mittelwert \pm SD	Mittelwert \pm SD	Mittelwert \pm SD
Ktr	10,05 ^a \pm 1,752	19,227 \pm 11,191	1 \pm 0,863
HG	10,14 ^{a,b} \pm 2,227	17,883 \pm 13,996	0,98 \pm 1,251
NG	10,69 ^{a,b} \pm 1,823	19,184 \pm 12,041	0,71 \pm 0,263
MgK	9,86 ^{a,b} \pm 1,827	18,325 \pm 13,423	0,95 \pm 0,737
Mg	9,66 ^b \pm 1,605	15,605 \pm 91,855	0,95 \pm 1,260
K	10,73 ^a \pm 1,282	19,134 \pm 92,273	0,71 \pm 0,273

4. Diskussion

4.1 Einfluss von Ionenimbilanzen auf die Elterngeneration

4.1.1 Gonaden

Osmotischer Stress führt über die primäre Stressantwort Cortisol und die erforderlichen energieintensiven Anpassungen hauptsächlich zu indirekten Effekten bei der männlichen und weiblichen Gametogenese. Reproduktive Prozesse können durch Stress gehemmt oder beschleunigt werden. Geringfügiger Stress kann sich positiv auswirken (Eustress), während ein hohes Stressniveau und eine energieintensive Stressantwort die Reproduktion bei Fischen negativ beeinflussen können (Schreck 2010). Auch an welchem Zeitpunkt im Lebenszyklus der Fische ein Stressfaktor wirkt, die Fischart selbst und ihre jeweilige Fortpflanzungsstrategie sowie die herrschenden Umweltbedingungen – wie eine erhöhte Salinität und Ionenimbilanzen – determinieren die Effekte von Stressoren auf die Reproduktion (Schreck, Contreras-Sanchez u.a. 2001). Die Anpassung an Stressfaktoren wirkt sich auf die Energieverteilung im Organismus aus, welcher teilweise die Energieinvestition in Fekundität und Fertilität in Stresssituationen verringert (Schreck 2010).

Bei den Weibchen in dieser Studie wurden keine Unterschiede der RKF-Werte und der gonadosomatischen Indizes festgestellt. Die histopathologischen Untersuchungen der Ovarien erbrachten jedoch in den vitellogenen Reifestadien zum Teil höhere Zellanzahlen in der MgK und NG. In der NG wurden auch die signifikant größten Dottergrößen festgestellt. Die Dottergrößen der MgK unterschieden sich dagegen nicht signifikant von der Ktr. Die Oozytengrößen der MgK waren im perinukleären, kortikal/alveolären und frühvitellogenen Stadium signifikant kleiner als die Oozyten der Ktr. Die Legewahrscheinlichkeit als Hinweis auf die Fekundität ist bei der MgK nur 2,01 % niedriger als bei der Ktr. Bei der NG liegt sie 15,95 % unter jener der Ktr. Interessant ist, dass bei der HG mit 17,96 % geringerer Legewahrscheinlichkeit und den signifikant kleinsten Dottergrößen keine signifikanten Effekte auf die Oozytenanzahl und -größe festgestellt wurden.

In anderen Studien wurden auf die finalen Stadien der Gametogenese hauptsächlich negative Effekte verschiedener Stressfaktoren festgestellt (Milla, Wang u.a. 2009). In einer Studie von Clearwater und Pankhurst (1997) reagierten wilde *Chelidonichthys kumu*, die längere Zeit Haltungsstress ausgesetzt waren, mit einer gesteigerten Follikelatresie in den vitellogenen

Oozyten. Bei *Tilapia zillii* führte länger andauernder Haltungsstress zu signifikant niedrigeren Anteilen vitellogener Oozyten und signifikant höheren Anteilen perinukleolärer Oozyten sowie zu erhöhten Vorkommen von Atresien (Coward, Bromage u.a. 1998). Besonders bei Salmoniden wurde der Einfluss von Stress auf die Reproduktion in verschiedenen Studien nachgewiesen. Roy, Ruby u.a. (1990) konnten bei laichreifen Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) nach chronischem Säurestress einen Abfall der Plasmavitellogenin-Konzentration feststellen. Ein Mangel an Vitellogenin im Dotter kann vor allem auf die späteren Embryonalstadien entwicklungshemmende Effekte ausüben. In einer Untersuchung von Regenbogenforellen unter Sauerstoffstress wiesen weibliche Tiere am Ende der Studie keine Unterschiede in Körperlänge und Gewicht auf. Allerdings führte Stress während der reproduktiven Entwicklungsphase zu einer signifikanten Retardierung der Ovulation, reduzierten Eigrößen und erhöhten Mortalitätsraten bei den Nachkommen (Campbell, Pottinger et al. 1992). Beim Seesaibling *Salvelinus alpinus* konnte ebenfalls ein Absinken des Plasmavitellogenin durch Cortisol-Behandlungen festgestellt werden (Berg, Modig u.a. 2004). Außerdem wurde in anderen Studien eine unterdrückende Wirkung von Cortisol auf die Plasmagonadotropin-Level von *Salmo trutta* und *Oncorhynchus mykiss* festgestellt (Carragher, Sumpter u.a. 1989). Die inhibierende Wirkung von Cortisol auf die finalen Stadien der Gonadenreifung erfolgte indirekt über Androgenhemmung (Nagahama und Yamashita 2008, Milla, Wang u.a. 2009).

Die in dieser Studie festgestellten Effekte auf die Oozytengrößen und -anzahlen sind variabel, zum Teil widersprüchlich und eher moderat. Es handelt sich wahrscheinlich um transiente Effekte. In den Gonaden der ZF sind durch die asynchrone Ovulation und Spermiation jeweils mehrere Reifestadien der Gonadenzellen in einer Gonade vorhanden (Aytekin und Yüce 2008, Nagahama und Yamashita 2008). Die hemmende oder fördernde Wirkung von chronischem osmotischem Stress wird deshalb wahrscheinlich weniger deutlich als bei Gonaden zyklisch laichender Fischarten. Ein wesentlich deutlicherer Indikator für die Effekte von osmotischem Stress auf die adulten ZF war in dieser Studie der reproduktive Output (Legefrequenz, Eianzahl und Dottergröße).

Die Salzbehandlungen wirken nicht direkt, z. B. als endokrine Disruptoren, sondern indirekt aufgrund des erhöhten Energiebedarfs, der für die Osmoregulation zur Verfügung gestellt wird, und weil dadurch weniger Energie für die Reproduktionsleistung und andere Körperfunktionen vorhanden ist. Dieser erhöhte Energiebedarf spiegelte sich in niedrigerer Masse, relativ zur Körperlänge, bei den Männchen der HG (RKF-Wert) im Vergleich zur K.

Die gonadosomatischen Indizes der Männchen unterschieden sich allerdings in allen Expositionsgruppen nicht von der Ktr. Betrachtet man den RKF-Wert als Maß für Ernährungszustand und Fitness, werden Energieressourcen offensichtlich auf Kosten des Individuums nicht aus der Reproduktion abgezogen. Auch die Abundanz der Spermatozytengrößen als Anhaltspunkt für die zur Reproduktion bereitstehenden Energieressourcen unterstützt diese These. Die relativen Häufigkeiten der Spermatiden, Spermatozyten und Spermatogonien sind in einigen Expositionsgruppen signifikant größer als bei der Ktr. In der HG, MgK und Mg waren die Spermatogonien, in der Mg die Spermatozyten und in der NG, Mg und K die Spermatiden abundanter als in der Ktr.

In den meisten anderen Studien wird eine inhibierende Wirkung von Cortisol auf die Reproduktionsphysiologie von männlichen Fischen festgestellt (Milla, Wang u.a. 2009). Dabei wirkt Cortisol z. B. beim Karpfen (*Cyprinus carpio*) hemmend auf die Sex-Steroid-Sekretion während der Spermatogenese und verlangsamt (Consten, Lambert u.a. 2002). Eine Langzeitbehandlung mit Cortisol beim männlichen Karpfen (*Cyprinus carpio*) senkte die LH- und FSH-mRNA-Level in der Hypophyse, das LH-Plasmalevel und die Androgenproduktion in den Gonaden. Dies äußerte sich auch in den gonadosomatischen Indizes und im verspäteten Einsetzen der ersten Spermatogenese (Consten, Bogerd u.a. 2001). Chronischer Stress führte bei männlichen Streifenbarschen (*Morone saxatilis*) zum Absinken der Plasmatestosteron- und 11-Ketotestosteronwerte, was sich in einer früheren und verkürzten Spermiation widerspiegelte (Castranova, King u.a. 2005).

In dieser Studie konnten keine inhibierenden Effekte auf die Gonadenmorphologie der Männchen festgestellt werden. Der durch die Salzexpositionen verursachte osmotische Stress wirkt in dieser Studie eher förderlich auf die Abundanzen der spermatogenen Zellen. Dies könnte auf eine hormetische Wirkung der Salzbehandlungen hinweisen. Der osmotische Stress kann zur Sicherstellung der Reproduktion scheinbar gut abgepuffert werden.

4.1.2 Kiemen

Die Kiemen sind ein Schlüsselorgan für eine Vielzahl von Stoffwechselvorgängen, wie Gasaustausch, Osmoregulation, Säure-Base-Regulation und die Ausscheidung von Stickstoffmetaboliten (Evans, Piermarini u.a. 2005). Als Hauptorgan der Osmoregulation sind die Kiemen auch erstes Zeigerorgan für osmotischen Stress (Moghadam, Abtahi u.a. 2013).

Bei allen exponierten Tieren wurden pathologische Veränderungen der Kiemen festgestellt. Die Effekte waren insgesamt moderat. Besonders häufig traten Hyperplasien auf, gefolgt von Epithelabhebungen und Fusionen. Es wurden nur sehr vereinzelt Aneurismen festgestellt. In den Expositionen NG und MgK traten besonders häufig Fusionen und auch starke Hyperplasien der Kiemenfilamente auf. Signifikant mehr moderate Epithelabhebungen als bei der Ktr wurden auch bei der HG und K festgestellt. Weibchen und Männchen unterschieden sich bezüglich der Häufigkeit der untersuchten Merkmale nicht voneinander.

Die Exposition von *Metynnis orinocensis* in Salzkonzentration von mehr als 10 g/l NaCl führte ebenfalls zu histopathologischen Veränderungen wie Aneurismen, Hyperplasien und Fusionen. Die Verdickung der Kiemenepithelien nahm mit steigender Salinität zu (Velasco-Santamaría und Cruz-Casallas 2008). In dieser Studie entspricht die elektrische Leitfähigkeit in der HG einem NaCl-Gehalt von ca. 4,3 g/l.

Hyperplasien entstehen durch die Proliferation von Pflaster-, Schleim- und Chloridzellen (McDonald und Wood 1993). Die Vermehrung der Zellschichten (in Hyperplasien) setzt die Durchlässigkeit des Kiemenepithels herab. Epithelabhebungen haben einen ähnlichen Effekt. Hier wird die Ionenaufnahme durch die Störung der Tight Junctions verringert (Wood 2017). Die Symptome bedingen sich zum Teil gegenseitig. Die Proliferation der Epithelzellen führt zu einer Ausdehnung der Filamente, welche zu Deformationen, Epithelabhebungen und letztendlich zu Fusionen von Filamenten führen (Poleksić und Karan 1999, Adriano, Arana u.a. 2005). Die Verdickung des Epithels durch Zellproliferation, Epithelabhebungen und die Fusion von Kiemenfilamenten vergrößert die Diffusionsbarriere des Kiemenepithels (Nowak 1992). Die Dicke der Barrierschicht zwischen Fischblut und Außenmedium vergrößert sich und der Diffusionsweg wird verlängert. Gleichzeitig wird auch die Interlamellardistanz verringert, welche für die Atemfunktion wichtig ist. Neben ihrer Funktion als Schlüsselorgan für die Osmoregulation sind Kiemen natürlich das Hauptatemorgan von Fischen (Evans 2008). Eine stärkere Diffusionsbarriere vermindert nicht nur den Ionenaustausch, sondern ist auch hinderlich für einen Gasaustausch und kann über lange Zeiträume die Fitness von Fischen herabsetzen (Shahriari Moghadam, Abtahi u.a. 2013). Auf der anderen Seite führt die Verdickung des Filamentepithels auch zu einer verringerten Durchlässigkeit für verschiedene umwelttoxische Stoffe (Nero, Farwell u.a. 2006).

Mallatt (1985) kommt in einer Vergleichsstudie zu dem Schluss, dass histopathologische Veränderungen wie Hyperplasien, Epithelabhebungen, Fusionen und Aneurismen eine

generalisierte, unspezifische physiologische Reaktion auf verschiedene spezifische Toxikanten und Stressfaktoren sind. Epithelabhebungen sind Symptome, die hauptsächlich bei Süßwasserfischen vorkommen und mit der Osmolarität des Außenmediums assoziiert sind. Die Hyperplasien, Epithelabhebungen und Fusionen, die bei den ZF festgestellt wurden, sind eine defensive Antwort auf die subletalen Salzkonzentrationen in den Expositionen. Nur die Aneurismen, die sehr selten und hauptsächlich in der HG festgestellt wurden, ordnet Mallatt (1985) als histopathologische Antwort auf akuten Stress ein. In den Expositionen herrschen für ZF hypersaline Bedingungen, vor allem in der HG und NG. Die in allen Expositionen festgestellten strukturellen Veränderungen des Kiemenepithels stellen eine Anpassung an chronischen osmotischen Stress dar.

4.1.3 Cortisol

Cortisol ist der am häufigsten verwendete Stressindikator. Als universelle Stressantwort wird der Cortisolspiegel im Blutplasma erhöht, was weiterführende, sekundäre (z. B. Energiemetabolismus) und tertiäre (z. B. Wachstum, Reproduktion) Stressantworten initiiert und die physiologische Anpassung an den Stressor ermöglicht (Schreck et al., 2001). Der Cortisolspiegel senkt sich in der Regel kurz nach der Stressexposition wieder auf den Basalwert ab, kann aber auch über längere Zeit erhöht bleiben.

In dieser Studie waren in der HG und K die Cortisolspiegel nach sechs Wochen immer noch signifikant erhöht. Sowohl die Exposition mit den höchsten Salzkonzentrationen (HG) als auch die erhöhte K^+ -Konzentration in der K führen in der Langzeitexposition offenbar zu einer Dauerbelastung, die bei ZF chronischen Stress auslöst. Die festgestellten Unterschiede weisen auf moderate Effekte hin. In den anderen Salzexpositionen wurden keine erhöhten Cortisolspiegel festgestellt. Die ZF hatten sich in diesen Expositionen entweder schon an die osmotischen Bedingungen akklimatisiert und die Cortisolwerte sind auf die Basalwerte zurückgegangen oder die Ionenimbalancen und -konzentrationen waren zu gering und die osmotischen Verhältnisse benötigen keine Anpassung der ZF. Letzteres ist jedoch unwahrscheinlich, da die histologischen Veränderungen der Kiemen aller Expositionsgruppen Anpassungen an osmotischen Stress, in Form eines verdickten Kiemenepithels, aufweisen. Interessant ist, dass erhöhte Konzentrationen von K^+ anders als Mg^{2+} eine dauerhafte Erhöhung der Cortisolspiegel verursachen. Eine erhöhte Ionenkonzentration beider Ionenpezies in der KMg führte offenbar sogar zu einem signifikant niedrigeren Cortisolspiegel als

in der K. Mg^{2+} ist offensichtlich in der Lage, den durch erhöhte K^+ -Konzentration induzierten osmotischen Stress zum Teil zu kompensieren.

In anderen Studien wurden ähnliche Effekte festgestellt. Stressoren unterschiedlicher Art induzierten eine initiale Stressreaktion, welche den Cortisolspiegel erhöhte und während der physiologischen Anpassung allmählich wieder abnahm (Jeney, Galeotti u.a. 1997, Kammerer, Cech Jr u.a. 2010). Chronischer Stress manifestiert sich in stark erhöhten Cortisolwerten über einen längeren Zeitraum (Pickering und Pottinger 1989). Ein allmähliches Absinken der Cortisolkonzentrationen – auch unter chronischen Stressbedingungen – ist die Folge unterschiedlicher physiologischer Anpassungen, die letztendlich zur Akklimatisierung des Organismus führen (Barton, Schreck u.a. 1987, Mommsen, Vijayan u.a. 1999, Jentoft, Aastveit u.a. 2005). Piato, Capiotti u.a. (2011) setzten ZF zufallsabhängigem, fluktuierendem, chronischem Stress aus, woraufhin die Cortisol-Plasmaspiegel nach 14 Tagen immer noch erhöht waren. Das Induzieren von akutem und chronischem Stress durch erhöhte Besatzdichten führte bei ZF zu einem im Vergleich zum Basalwert vierfach erhöhten Ganzkörper-Cortisolspiegel, der mehrere Tage anhielt (Ramsay, Feist u.a. 2006). Die in dieser Studie im Vergleich zur Ktr ca. 1,5-fach erhöhten Plasmacortisolspiegel in HG und K lassen auf ein eher geringes Stressniveau schließen. Karpfen reagierten während der Akklimatisierung von Süßwasser auf 1,5 % Salzwasser, die mehrere Tage dauerte, mit einer Erhöhung der Cortisol- und Glukosekonzentration. Die erneute Reakklimatisierung an Süßwasser verursachte keine signifikanten Veränderungen des Cortisol- und Glukosespiegels (Hegab und Hanke 1984).

Die erhöhten Cortisolwerte der HG und K in dieser Studie weisen auf einen erhöhten Energieaufwand für die Osmoregulation in diesen Expositionsgruppen hin. Cortisol steuert die Anpassung an hyperosmotische und hypoosmotische Umgebungsmedien auf verschiedenen Wegen. Es reguliert sowohl den allgemeinen Prozess der Neuordnung des Energiestoffwechsels (Laiz-carrión, Martín Del Río u.a. 2003) als auch die Aktivierung von Na^+/K^+ -ATPase und die Proliferation von Chloridzellen in den Kiemen (Madsen, Jensen u.a. 1995, McCormick 1990, McCormick 1995) und im Darm (Seidelin, Madsen u.a. 1999). In den meisten Teleostiern hat Cortisol in Bezug auf die osmoregulatorische Anpassung eine duale Funktion. Im Verbund mit Wachstumshormon und dem Wachstumsfaktor IGF-1 steuert Cortisol die Umwandlung von Chloridzellen in den sogenannten Seewassertyp und die Ionenexkretion über die Haut bei der Anpassung an hypersaline Verhältnisse. In Verbindung mit Prolaktin fördert Cortisol die Anpassung an hyposaline Verhältnisse durch die Proliferation von Chloridzellen des Süßwassertyps (McCormick 2001).

Süßwasserfische müssen, um dem Ionenüberschuss in hypersalinen Gewässern entgegenzutreten, aktiv Natrium- und Chloridionen ausscheiden. In den Kiemen als Primärorgan der Osmoregulation dienen die Chloridzellen, welche im Kiemenepithel sitzen, der Ionensekretion. Diese sind mitochondrienreiche Zellen, die mittels Na^+/K^+ -ATPase Ionen nach außen transportieren. Die Salinitätstoleranz bei Süßwasserfischen steht mit den entsprechenden physiologischen, biochemischen und morphologischen Anpassungen an die entsprechende Salinität in Zusammenhang (Sardella, Matey u.a. 2004). Neben Anpassungen der Chloridzellen kann auch die Permeabilität des Kiemenepithels (Sardella, Matey u.a. 2004) und die der gesamten Körperoberfläche (Kültz und Onken 1993) zurückgesetzt werden. Verbunden mit der Permeabilität des Kiemenepithels wird allerdings auch die Sauerstoff-Verbrauchsrate vermindert (Sardella, Matey u.a. 2004). Der erhöhte Energieverbrauch für die Osmoregulation geht infolgedessen mit einer Reduktion des Aktivitätsniveaus einher (Christina Swanson 1998).

4.1.4 PRL und GH

PRL und GH sind Teil einer Familie von Proteinen, die zu den Klasse-I-Zytokinen gehören. GH ist das Produkt der somatotrophen, PRL das Produkt der lactotrophen Zellen im Hypophysenvorderlappen (Kleine und Rossmanith 2007). GH und PRL haben zentrale Funktionen bei der Osmoregulation. In Teleostiern verhält sich die Aktivität der lactotrophen Zellen umgekehrt zu der Serumosmolarität und der entsprechenden Salinität im Umgebungsmedium (Nishioka, de Jesus u.a. 1993, Shepherd, Sakamoto u.a. 1999).

Bei den Männchen war die relative mRNA-Expression von PRL bei den Expositionen HG und NG am niedrigsten und signifikant niedriger als bei der Mg. Im Vergleich zur Ktr waren die Unterschiede allerdings nicht signifikant. Bezüglich der mRNA-Expression von PRL bei den Weibchen wurden keine Effekte festgestellt. Bei beiden Geschlechtern wurden keine Effekte der Salzexpositionen auf die GH-mRNA-Expression festgestellt. Dies kann ein Hinweis auf eine Anpassung des PRL-Expressionsspiegels an die hohen Salzkonzentrationen der NG und HG bei den Männchen sein. Erhöhte RKF-Werte bei den Männchen der HG weisen ebenfalls auf eine erhöhte Sensibilität der Männchen bei Salzstress hin. Pottinger, Pickering u.a. (1992) beobachteten ebenfalls eine Verringerung des Plasma-PRL im Verhältnis zu erhöhtem Plasma-Cortisolspiegel bei Regenbogenforellen. PRL und GH werden in Zebrafischlarven in verdünntem Süßwasser deutlich hochreguliert (Hoshijima und Hirose 2007). Bei GH wird dieser Prozess mit dem notwendigen Knochenwachstum und dem

limitierten Zugang zu Ca in diesem Medium in Zusammenhang gebracht (Hoshijima und Hirose 2007). Bei Zugabe von Ca senkte sich der GH-Spiegel wieder.

PRL ist ein wichtiges Hormon der Regulation von Flüssigkeits- und Ionenhomöostase bei Fischen. Die Homöostase wird durch Ionenretention oder Ionensekretion in den peripheren Organen der Osmoregulation geregelt. In Fischen ist PRL das Hormon der Süßwasseradaptation. Um die Homöostase in hypotonen Medien aufrechtzuerhalten, verstärkt PRL die Retention von Ionen, hauptsächlich Na^+ und Cl^- . Außerdem setzt es die Wasserdurchlässigkeit der Membranen von Kiemen und Haut, aber auch von Nieren, Darm und Blase herab (Manzon 2002, Porter und El Halawani 2001). Die Hauptorgane der Osmoregulation wie Kiemen, Nieren und Darm haben die höchsten Level an PRL-Rezeptoren (Manzon 2002). PRL beeinflusst die Ionenbalance hauptsächlich über die Na^+/K^+ -ATPase. Dabei kann es die ATPase-Aktivität entweder verstärken oder abschwächen oder auch keinen Einfluss haben (Manzon 2002). Die Wasserpermeabilität von Membranen wird durch PRL herabgesetzt (Brown und Brown 2014). Die Schleimzellen in den Kiemen werden angeregt und die vermehrte Schleimproduktion verhindert den Ionenverlust im Süßwasser (Horseman 1987). In Teleostiern haben Plasmafaktoren wie Cortisol und Osmolarität einen direkten regulatorischen Einfluss auf die PRL-Sekretion (Tatsuya Sakamoto und McCormick 2006). PRL steuert in Verbindung mit Cortisol die Proliferation von Chloridzellen zum Süßwassertyp. Außerdem inhibiert PRL die Entwicklung von Chloridzellen in Kiemen des Salzwassertyps (Herndon, McCormick u.a. 1991).

PRL hat neben seinem wichtigen Stellenwert in der Osmoregulation von Fischen noch viele andere Funktionen, unter anderem bei der Pigmentierung, der saisonalen Anpassung, dem Wachstum, dem Immunsystem und der Reproduktion (Khong, Kuah u.a. 2009). PRL spielt eine wichtige Schlüsselrolle bei verschiedenen Aspekten der Reproduktion von Fischen wie der Initiation von Migration als Teil des Reproduktionszyklus und dem Brutpflegeverhalten bei Maulbrütern, Nestbauern und Ventilierern. (Whittington und Wilson 2013). PRL konnte als wichtiger Faktor in der Initiation der sexuellen Reife bei Fischen nachgewiesen werden (Degani, Yom-Din u.a. 2010). PRL scheint in die Regulation der Spermatogenese, Vitellogenese und Ovulation eingebunden zu sein (Whittington und Wilson 2013). Bei ZF-Embryonen und -Larven wurde die zentrale Bedeutung von GH und PRL in der Embryonal- und Larvalentwicklung nachgewiesen (Nguyen 2010).

GH ist genau wie PRL ein extrem pluripotenten Hormon. Es spielt in vielen wichtigen physiologischen Prozessen eine tragende Rolle. Neben der Regelung des Ionen- und Wasserhaushaltes des Körpers regelt es auch den Lipid-, Kohlenhydrat- und Fettsäuremetabolismus. GH spielt außerdem eine wichtige Rolle im Wachstumsprozess, dem Immunsystem und der Fortpflanzung. Neuere Studien weisen auch auf einen Einfluss auf die einhergehenden Verhaltensweisen wie Appetit, Fressverhalten, Aggression etc. hin (Reinecke, Björnsson u.a. 2005). Die Wirkmechanismen von GH in Bezug auf die Salzwasseranpassung sind vor allem auf die Steuerung der Proliferation der Chloridzellen zum Salzwassertyp und die Steigerung der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität in den Kiemen zurückzuführen.

Die mRNA-Spiegel von GH blieben bei beiden Geschlechtern unverändert, was ein Indikator dafür sein könnte, dass eine Anpassung an den Salzstress schon stattgefunden hat. Die Anpassung an eine erhöhte Ionenkonzentration durch Verringerung der PRL-Sekretion könnte aber auch ausreichend und eine weitergehende Salzanpassung nicht notwendig sein. Auf der anderen Seite könnten höhere Ionenkonzentrationen eine niedrigere PRL-Konzentration unterstützen, um die Permeabilität der Haut zu reduzieren.

Die Wirkmechanismen von GH in Bezug auf die Osmoregulation von euryhalinen Fischen ist gut erforscht und die Schlüsselrolle von GH in der Salzwasseranpassung konnte bei Spezies unterschiedlichster phylogenetischer Abstammung nachgewiesen werden (Tatsuya Sakamoto und McCormick 2006). GH kann sowohl die Anzahl als auch die Größe der Chloridzellen sowie die Anzahl der Ionen sekretierenden Transportproteine erhöhen (McCormick 2001). GH-Rezeptoren finden sich in der Leber und auch in den osmoregulatorischen Hauptorganen (Kiemen, Nieren und Darm), wo sich ihre Anzahl nach einer Salzwasserexposition erhöht (Sakamoto und Hirano 1991). Bei stenohalinen Fischen wie dem ZF ist die genaue Rolle von GH bei der Anpassung an hypersaline Verhältnisse weniger gut erforscht. Unter der Annahme, dass GH diese Anpassungsfähigkeit erhöht, wurden GH-transgene ZF verschiedenen hypersalinen Medien ausgesetzt (Almeida, Martins u.a. 2013). Die GH-Transgenen (Überexpression von GH) wiesen dabei allerdings eine höhere Mortalität im Vergleich zu den nicht transgenen ZF auf. Grund hierfür ist die Rolle von GH im Energiemetabolismus der Fische. Während bei isoosmotischen Bedingungen zusätzliche Energie für ein verbessertes Wachstum zur Verfügung steht, verbraucht die Osmoregulation bei hyper- bzw. hypoosmotischen Bedingungen bis zu 20-68 % des vorhandenen Energiebudgets bei Fischen (Boeuf und Payan 2001). Bei den transgenen ZF wurde hierbei nachgewiesen, dass der GH-Überschuss

exzessive Proteinsynthese mit einhergehendem Energieverlust und oxidativem Stress generiert (Almeida, Martins u.a. 2013).

4.1.5 LH und FSH

FSH und LH sind chemisch verwandt und werden bei Knochenfischen auch GtH I und GtH II genannt. In der sogenannten HPG-Achse (*engl.* hypothalamus-pituitary-gonad axis) spielen FSH und LH eine Schlüsselrolle bei der Gonadenentwicklung und deren Funktionalität (Swanson, Dickey u.a. 2003). Die Expression und Sekretion von LH und FSH wird durch eine Vielfalt neuroendokriner Faktoren des Hypothalamus und endokriner Hormone der Gonaden und anderer peripherer Organe gesteuert. In Teleostiern sind das Gonadotropin releasing Hormon (GnrH) und der Neurotransmitter Dopamin (DA) als Inhibitor die wichtigsten Steuerfaktoren. Sexualsteroid der Gonaden kontrollieren bei beiden Geschlechtern durch positives und negatives Feedback LH und FSH als Hauptregulationsfaktoren der Gonaden. Fischen fehlt im Gegensatz zu anderen Vertebraten das Hypothalamus-Hypophysen-Portalsystem, und die gonadotropen Zellen in der Hypophyse werden direkt von den GnRH-Neuronen (neurosekretorische Neurone) innerviert und neuronal angeregt, LH und FSH zu produzieren (Zohar, Muñoz-Cueto u.a. 2010). Die Gonadotropine gelangen in den Kreislauf und binden sich an spezifische Membranrezeptoren der Gonaden. Bei Männchen sind das entsprechend die Sertoli- oder Leydig-Zellen. Die Gonaden produzieren einerseits Keimzellen (Spermatogenese), andererseits auch Regulatoren wie Geschlechts-Steroide und Wachstumsfaktoren. Diese für die Reproduktion wichtigen Faktoren wirken parakrin oder autokrin im Gonadengewebe oder endokrin über die positive und negative Feedback-Steuerung des Hypothalamus und der Hypophyse (Weltzien, Andersson u.a. 2004). Zur Synchronisation der Gonadenentwicklung und -reifung und des Fortpflanzungsgeschehens findet eine permanente Kommunikation zwischen dem Hypothalamus-Hypophysen-Komplex und den Gonaden statt.

In dieser Studie wurden nur die relativen mRNA-Expressionslevel von FSH bei den Männchen in der NG erhöht. Der Unterschied war lediglich im Vergleich zur MgK signifikant. Die LH-Expressionsniveaus beider Geschlechter und die FSH-Expressionslevel der Weibchen unterschieden sich in den Testgruppen nicht signifikant.

Bei asynchroner Gonadenentwicklung (z. B. Goldfisch, ZF) gibt es in den Gonaden zur gleichen Zeit Oozyten in verschiedenen Reifestadien. Da für die vitellogene Reifephase und die Endreifephase FSH und LH benötigt werden, kommt es zu einer Art paralleler Fluktuation von LH und FSH im Plasmaspiegel. Dabei sind beide GTs niedrig in unreifen Juvenilen, am

höchsten in reifen Adulten und am niedrigsten in sexuell unterentwickelten Adulten (Sohn, Yoshiura u.a. 1998, Yaron, Gur u.a. 2003). Bei Cypriniden scheinen außerdem verschiedene Funktionen von FSH durch das reichlicher vorhandene LH übernommen zu werden (Sohn, Yoshiura u.a. 1998). In den Follikeln von Zebrafischen werden FSH- und LH-Rezeptoren in den frühen vitellogenen Phasen nur geringfügig exprimiert. FSH steigt in der frühen vitellogenen Phase und während der Wachstumsphase an und sinkt vor der späten Reifephase wieder ab. LH dagegen steigt in der späten vitellogenen Reifephase an und gipfelt bei Erreichen der vollen Oozytengröße (Kwok, So u.a. 2005, Zhou, Tsang u.a. 2011).

Das erhöhte FSH-Expressionslevel in der NG korrespondiert mit der erhöhten relativen Spermatidenhäufigkeit in dieser Exposition. Das könnte auf eine verfrühte Spermienreifung hindeuten. Allerdings waren auch die Spermatiden in der Mg und K abundanter als in der Ktr. Die Effekte sind insgesamt relativ gering. Offensichtlich führen die Salzexpositionen kaum zu Effekten auf die Genexpression der Gonadotropine.

4.2 Einfluss von Ionenimbilanzen auf die Reproduktionsleistung

In der HG (10 %) und der NG (49 %) war der Anteil normal entwickelter Eier am geringsten – unabhängig davon, ob diese befruchtet oder unbefruchtet waren. Eine hohe Ionenkonzentration und die Kombination von Cl^- , Mg^{2+} und K^+ führten offenbar zu einer Verschlechterung der Gametenqualität der Weibchen. Die Expositionen mit geringerer Salzkonzentration bzw. nur einem Salz (Mg: 86%, K: 94 %) oder einer einzelnen Salzkombination (MgK: 89 %), führten im Vergleich zur Ktr (90 %) kaum zu Effekten. Betrachtet man neben der Eiqualität auch den Befruchtungserfolg, stellt sich offensichtlich der Effekt erhöhter Mg-Konzentrationen in Form eines erhöhten Anteils unbefruchteter Eier bei der Mg (57 %) und MgK (43 %) dar. Kalium scheint hier eine gewisse Abschwächung dieses Effekts zu bewirken. Hohe Ionenkonzentrationen und Ionenimbilanzen setzen also entweder die Befruchtungsfähigkeit der weiblichen Gameten und die Wahrscheinlichkeit einer normalen Weiterentwicklung herab oder sie stören die Befruchtungsfähigkeit der männlichen Gameten.

Spermienzellen sind in den Samenkanälen noch unbeweglich. Erst nachdem sie in das Umgebungsmedium entlassen werden, erfolgt eine Aktivierung. Sowohl die Initialisierung als auch die Kapazität der Spermienbeweglichkeit wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Diese sind neben dem pH-Wert, der Osmolarität und der Temperatur des Außenmediums vor allem die umgebenden Konzentrationen von Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} und Cl^- (Alavi und Cosson

2006). Bei den Salmoniden ist vor allem eine niedrigere exogene K^+ -Konzentration entscheidend für die Spermienaktivierung. Bei den Cypriniden ist die Hypoosmolalität des Umgebungsmediums gegenüber der Samenflüssigkeit wichtigster Aktivierungsfaktor (Cosson 2004). Bei Karpfen (*Cyprinus carpio*) wirkt z. B. eine erhöhte K^+ -Konzentration im Samentrakt durch Kaliumkanäle in der Samenzelle inhibierend auf die Spermienbeweglichkeit (Krasznai, Márián u.a. 1995, Krasznai, Márián u.a. 2000). Allerdings ist auch bei Karpfen eine Reaktivierung der Spermienbeweglichkeit, z. B. nach Kryolagerung, durch die Behandlung mit K möglich (Redondo-Müller, Cosson u.a. 1991). Ca^{2+} benötigen Cypriniden für die Aktivierung der Spermienzellen als intrazellulären aber nicht als extrazellulären Faktor (Krasznai, Márián u.a. 2000). Allerdings können erhöhte extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen die inhibierende Wirkung von K^+ auf die Spermienbeweglichkeit zum Teil aufheben (Cosson, Cosson u.a. 1991, Redondo-Müller, Cosson u.a. 1991). In Bezug auf die Wirkung von Mg auf die Spermienbeweglichkeit von Karpfenfischen gibt es relativ wenige Informationen. Eine Studie von Krasznai, Morisawa u.a. (2003) wies keine Effekte von $CaCl_2$ oder $MgCl_2$ auf die Beweglichkeit von Karpfenspermien in Befruchtungslösungen nach.

In dieser Studie wurde in der Mg und in geringerem Maße in der MgK der höchste Anteil an unbefruchteten Eiern festgestellt. Die hohe Mg^{2+} -Konzentration kann also einerseits die Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen hemmen, andererseits könnte sie auch den Befruchtungsprozess selbst oder die Befruchtungsfähigkeit der Fischeier beeinflussen. Unbefruchtete Eier durchleben eine Serie automatisch ablaufender Entwicklungsschritte nach dem Kontakt mit Wasser. Dieser Prozess könnte durch eine erhöhte Salinität gestört werden und später zur Koagulation führen. In dieser Studie konnte allerdings nicht festgestellt werden, ob deformierte Eier im Vorfeld einer Fehlentwicklung schon befruchtet waren oder nicht.

ZF-Eier werden durch den Kontakt mit dem Außenmedium aktiviert und erst später befruchtet. Diese parthenogenetisch aktivierten Eier vollziehen dann, auch wenn keine Spermien vorhanden sind, automatisch einige abortive Zellteilungsschritte (Lee, Webb u.a. 1999). Wenn Spermien im Laichmedium vorhanden sind, laufen im Ei identische Entwicklungsschritte ab. Die Zellteilung schreitet normal voran und der Embryo entwickelt sich weiter. Der Aktivierungsprozess beginnt über eine zytosolische Ca-Welle innerhalb der Zelle. Diese freie zytosolische Ca-Oszillation, die das Ei vom animalen zum vegetativen Pol durchläuft, initialisiert den Härtungsprozess. Dafür wird allerdings kein Ca im Außenmedium

benötigt (Lee, Webb u.a. 1999). Ca wird in der Zelle in Speicherkompartimenten wie den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum, nicht jedoch im Zytosol gespeichert (Dolmetsch, Xu u.a. 1998). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Mg^{2+} im Außenmedium den Aktivierungsprozess initialisieren kann (Lindsay, Hertzler u.a. 1992).

In einer Studie von Sawant, Zhang u.a. (2001) wurden ZF-Eier in NaCl-haltigem Wasser inkubiert. Bei einer Salinität über 4 ‰ teilten sie sich synchron bis zum 32-Zell-Stadium. Im 128-Zell-Stadium begannen die Blastomere, sich vom Blastoderm zu lösen. Der perivitelline Raum expandierte, das Ooplasma kollabierte und alle Embryonen koagulierten. Der hohe Anteil deformierter (HG: 79 %, NG: 38 %) und koagulierter Eier (HG: 11 %, NG: 13 %) bei der HG und der NG bestätigt diese Ergebnisse.

Süßwasserfische sind bei erhöhter Salinität und Ionenimbilanzen gezwungen, mehr Energie für die Osmoregulation und die Aufrechterhaltung der Homöostase aufzuwenden. Dadurch können weniger Energieressourcen in die Reproduktion und die Qualität der Gameten investiert werden. Ein wichtiges Merkmal für die Gametenqualität ist die Größe der Dottersäcke. Größere Dotter sind Hinweis auf eine höhere metabolische Investition der adulten Tiere in den Nachwuchs. In dieser Studie wies die HG signifikant kleinere Dottergrößen als die Ktr auf, aber die NG hatte signifikant den größten Dotter. Auch bei der MgK wurden signifikant größere Eier als bei der Ktr festgestellt. Die Dottersackgröße der NG könnte ein Hinweis auf eine Form terminaler Investition sein (Velando, Drummond u.a. 2006, Schreck, Contreras-Sanchez u.a. 2001). Ungünstige Umweltbedingungen wie hohe Ionenkonzentrationen und adverse Ionenverhältnisse können zu einer Erhöhung der Energieinvestition in die Reproduktion führen. Dies bewirkt einerseits einen größeren möglichen Erfolg für die Nachkommen, ist andererseits aber zum Schaden der Elterntiere (Billman und Belk 2014). Ein solcher Ressourcenausgleich ist allerdings nicht mehr möglich, wenn der Energiebedarf für die Osmoregulation zu groß wird. Die kleineren Eigrößen der HG gegenüber der NG können als Hinweis für ein Erreichen dieser Grenze interpretiert werden. Den Tieren in der HG ist es scheinbar nicht mehr möglich, ausreichend Energie in die Reproduktion bzw. in die Eidotter als Energievorrat der Nachkommen zu investieren.

Die Gelegegrößen bzw. die Anzahl der Eier pro Laichereignis unterschieden sich nicht signifikant. In Verbindung mit der Legefrequenz wurden hinsichtlich der Laichwahrscheinlichkeit während des gesamten Testzeitraumes bei allen Salzbehandlungen signifikant geringere Werte als bei der Ktr festgestellt. Bezüglich der Gametenqualität wiesen die NG und

MgK größere Dotter und die HG kleinere Dotter als die Ktr auf. Das kann auf einen Trade-off zwischen Gametenqualität und Gametenquantität hinweisen. Die Gametenqualität wird hier auf Kosten der Gametenquantität erhalten (Schreck, Contreras-Sanchez u.a. 2001). Bei saisonal laichenden Fischarten ist auch der Zeitpunkt der Stresseinwirkung während der Reifephase wichtig. Bei Regenbogenforellen verursachte akuter Stress, selbst neun Monate vor dem Ablaichen, ein signifikant späteres Ablaichen, kleinere Eier und niedrigere Überlebensraten der Nachkommenschaft (Campbell, Pottinger u.a. 1992). Moderater Stress in der frühen Vitellogenese führte zu kleineren Eiern und geringeren Larvengrößen. Stresswirkung während der Reifephase löste verfrühte Ovulation aus (Contreras-Sanchez, Schreck u.a. 1998). Lang andauernder chronischer Haltungsstress während der gesamten Gonadenreifung verursachte bei *Latris lineata* eine Steigerung der Eianzahl, allerdings wurde bei signifikant weniger Fischen überhaupt eine Ovulation festgestellt (Morehead, Ritar u.a. 2000).

Hohe Stresslevel bei den Elterntieren führen zu erhöhten Cortisolwerten in deren Laich. Dies ist besonders in den ersten zwei Tagen der Embryogenese der Fall. Der Embryo ist noch nicht fähig, eigene Hormone zu synthetisieren, und ist vom maternalen Hormonvorrat im Ei abhängig (Alsop und Vijayan 2008). In einer Studie von Steenbergen, Richardson u.a. (2011) wurden ZF-Embryonen während dieser Zeit erhöhten Konzentrationen von Corticosteroiden ausgesetzt. Sie reagierten darauf in späteren Entwicklungsstadien mit herabgesetzter Bewegungsfähigkeit, jedoch nicht mit Veränderungen im Wachstumsverhalten. In dieser Studie konnten allerdings, außer bei der Mg-Exposition, keine Effekte auf Körperlängenwachstum und Gewichtszunahme festgestellt werden.

4.3 Einfluss von Ionenimbilanzen auf die Nachkommen

4.3.1 Überlebens-, Schlupf- und Deformationsraten

Das Chorion und die innere perivitelline Membran dienen als Schutzbarriere für die Embryonen (Hisaoka 1958). Das Chorion der ZF ist durch ca. 0,17 µm große Poren durchlässig für kleinere Moleküle (Cheng, Flahaut u.a. 2007). Die Permeabilität dieser Chorionmembran steigt beim ZF von den frühen Teilungsstadien bis zum Schließen der Blastopore leicht an und erreicht ihr Maximum während der Epibolie (Harvey, Kelley u.a. 1983). Nach der Epibolie vermindert sich die Permeabilität erneut (Herrmann 1993). Die Durchlässigkeit sinkt allerdings nicht mehr auf das gleiche Niveau wie vor der Aktivierung

und Befruchtung (Mangor-Jensen 1987). In einer Studie von Sawant, Zhang u.a. (2001) wurden die frühen Teilungsstadien von ZF-Embryonen durch erhöhte Salinitäten ($> 2 \text{ ‰}$) deutlich beeinträchtigt. Die Salinitätstoleranz stieg aber mit fortschreitendem Entwicklungsstadium an. Das Gastrula-Stadium ist hierbei salztoleranter als das Blastula-Stadium und das Blastula-Stadium wiederum toleranter als die Teilungsstadien des Embryos. Bhattacharya, Zhang u.a. (2006) wiesen nach, dass bei den Embryonen der Prachtbarbe (*Pethia conchonius*) die Entwicklung der Schlupfdrüsen durch erhöhte Salinitäten so beeinträchtigt werden kann, dass es zum Schlupfversagen kommt.

Die F1-Generation, also die Nachkommen der exponierten Elterntiere aus dem RT, wurden bereits als Gameten in den Testwässern exponiert. Für weitere ELT wurden aus diesen Nachkommen normal entwickelte Embryonen für die weitere Exposition ausgewählt. In den meisten Toxizitätstests werden Embryonen zuerst im 2- bis 4-Zellstadium exponiert. In dieser Studie wurde sowohl verspätetes als auch vorzeitiges Schlüpfen – zum Teil sogar in der gleichen Exposition – festgestellt. Alle Expositionen wiesen an den ersten zwei Tagen einen höheren Anteil an vorzeitig geschlüpfen Larven und nach dem vierten und fünften Tag einen signifikant geringeren Anteil an geschlüpfen Larven im Vergleich zur Ktr auf. Die NG mit 14,3 % und die Mg mit 3,5 % wiesen den höchsten Prozentsatz an Larven mit Schlupfversagen auf. Diese Ergebnisse korrelierten positiv mit dem erhöhten Anteil deformierter Embryonen und Larven mit verzögerter Entwicklung bei diesen Expositionen. Magnesium ist wahrscheinlich der Bestandteil mit dem größten toxischen Potenzial in den Expositionen. Auch die Mortalitätsraten sind bei NG mit 26,7 % und Mg mit 9,5 % im Vergleich zur Ktr mit 0,8 % am höchsten. Obwohl die Sterblichkeitsraten zwischen den Expositionen unterschiedlich waren, blieben sie im Verlauf der Expositionszeit für jede Exposition relativ konstant. Ausnahmen bilden die NG mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate von 4,1 % und die Mg mit 2,1 % am sechsten Tag. Im Alter von fünf bis sieben dpf erscheinen Ionozyten auf den Kiemen der ZF-Larven und die Larven wechseln in den Kiemen zur aktiven Osmoregulation (Rombough 2002). Allgemein erhöhte Salz- und Mg^{2+} -Konzentrationen führen in dieser sensiblen Umstellungsphase offensichtlich zu erhöhter Sterblichkeit.

Beim Vergleich der Ergebnisse von F1-Embryonen aus dem RT mit den Ergebnissen des ELST mit Embryonen nicht exponierter Elterntiere wurde bei Mg und MgK und noch deutlicher bei NG signifikant mehr verzögerter Schlupf festgestellt. Die K unterschied sich nicht signifikant von der Ktr. Insgesamt sind die Effekte auf den Schlupf stärker als bei der F1-Generation aus dem RT. Die Mortalitäten der Embryonen und Larven von exponierten und

nicht exponierten Elterntieren ähneln sich. In beiden Testserien weisen die NG und Mg die höchsten Mortalitätsraten auf (Mg: 32,79 % und NG: 36,07 %). Diese werden gefolgt von HG mit 31,15 % und MgK mit 26,23 % Sterblichkeit. Neben einer höheren Mortalität im Alter von fünf bis sieben dpf wurde – wahrscheinlich aufgrund des Übergangs von endogener zu exogener Ernährung – eine höhere Mortalität im Alter von zehn bis zwölf dpf festgestellt. In dieser Lebenszyklusphase ist eine höhere Mortalität infolge der zugrunde liegenden physiologischen Anpassung des Stoffwechsels wahrscheinlich. Der Energiebedarf für den Entwicklungsschritt der Maulspaltenöffnung ist relativ hoch und könnte die Bereitstellung von ausreichend Energie für die Osmoregulation gefährden und umgekehrt (Xu, Liu u.a. 2017).

Im Vergleich zur Ktr wiesen die Embryonen aller Expositionen signifikant höhere Deformationsraten auf. Mit Ausnahme der Mg waren Deformationen des Herz-Kreislauf-Systems die häufigste Deformationskategorie, gefolgt von Missbildungen der Wirbelsäule. Bei der Mg waren Deformationen der Wirbelsäule etwas häufiger als Störungen des Herz-Kreislauf-Systems. Störungen des Herz-Kreislauf-Systems traten als perikardiales Ödem, verlangsamte oder fehlende Herzschläge und fehlender oder verlangsamter Blutkreislauf auf. Studien haben belegt, dass verschiedene chemische Giftstoffe – trotz unterschiedlicher Wirkmechanismen – die Leistungsfähigkeit des Herzens herabsetzen und infolgedessen eine ganz ähnliche symptomatische Antwort beim ZF hervorrufen: ein sogenanntes Herzinsuffizienz-Syndrom (englisch: syndrome of heart failure responses) (Chen 2013). Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass Ionenimbilanzen in kritischen Entwicklungsstadien ebenso zu Herzbeutelwassersucht, Kreislaufproblemen und Veränderungen der Herzmorphologie mit der möglichen Folge des Herzversagens führen.

4.3.2 Mineralgehalte und Mineralverhältnisse

In den Salzexpositionen konnten generell Verschiebungen der Mineralgehalte von Mg^{2+} , K^+ und Ca^{2+} der Fischlarven festgestellt werden. Im Vergleich zur Ktr wurden vor allem in der Mg niedrigere K^+ - und höhere Mg^{2+} -Gehalte festgestellt. In einer Studie von Wendelaar Bonga, Löwik u.a. (1983) wurde bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen im Außenmedium beim Mosambik-Buntbarsch (*Oreochromis mossambicus*) ebenfalls Hypokaliämie festgestellt. Als Folge der Effekte auf die Mineralgehalte wurden auch Ungleichgewichte in den $Ca^{2+}:Mg^{2+}$ -, $K^+:Mg^{2+}$ -, $K^+:Na^+$ - und $Ca:P$ -Verhältnissen festgestellt. Die meisten Effekte wiesen die Tiere in der Mg-Exposition auf. Im Vergleich zur Ktr wurden in der Mg-Exposition höhere

$K^+ : Mg^{2+}$ -, $K^+ : Na^+$ - und $Ca^{2+} : Mg^{2+}$ -Verhältnisse festgestellt. In der NG wurde ebenfalls ein höheres $Mg^{2+} : Ca^{2+}$ -Verhältnis als in der Ktr festgestellt.

Die Hauptaufnahme von Mg^{2+} in Süßwasserfischen erfolgt über die Nahrung. Die Mg^{2+} -Aufnahme über die Kiemen stellt einen sekundären Aufnahmeweg dar (Bijvelds, Velden u.a. 1998a). Der Mg^{2+} -Transport über die apikale Membran des Darmepithels geschieht elektro-diffusiv entlang eines negativen Membranpotenzials und ist mit K^+ assoziiert (Bijvelds, Kolar u.a. 2001). Bei Tilapien wird beispielsweise weniger als 20% Mg^{2+} , bei Karpfen maximal 16 % Mg^{2+} über die Kiemen aufgenommen (Flik, Velden u.a. 1993). Ähnlich wie bei Ca^{2+} ist in den meisten Gewässern die Mg^{2+} -Konzentration höher als in den Süßwasserfischen selbst (Flik, Velden u.a. 1993). In der extrazellulären Flüssigkeit ist die Mg^{2+} -Konzentration niedriger als die Ca^{2+} -Konzentration, während in der Zelle Mg^{2+} dominiert (Flatman 1991). Mg^{2+} beeinflusst die Ionenpermeabilität des Darmepithels. Eine geringe Mg^{2+} -Konzentration im Lumen induzierte eine höhere Körperkonzentration von Ca^{2+} in Regenbogenforellen, Tilapien und Guppies (Bijvelds, Velden u.a. 1998b). Der Einfluss von Mg auf den transmembranen Ionentransport wird besonders bei Mg^{2+} -Mangel deutlich, der vor allem das Gleichgewicht von Ca^{2+} , Na^+ und K^+ stört. Er geht mit der Calcifikation von Herz, Blutgefäßen und Nieren einher (Bijvelds, Velden u.a. 1998b). Mg^{2+} senkt außerdem die Ionenpermeabilität für Ca^{2+} in Fischkiemen (Wendelaar Bonga, Löwik u.a. 1983).

Mg^{2+} und seine Effekte auf Knochenfische wurden hauptsächlich in Bezug auf Mg^{2+} -Mangel im Futter untersucht. In Studien über Mineralstoffe in der Fischernährung hat sich eine ausreichende Mg^{2+} -Versorgung als essentiell für das Wachstum vor allem juveniler Fische herausgestellt (Dabrowska, Meyer-Burgdorff u.a. 1991).

Mg^{2+} -Mangel führte bei *Ictalurus punctatus* zu verringertem Wachstum, Anorexie, Reaktionsarmut, Muskelschwäche und höherer Mortalität (Gatlin 3rd, Robinson u.a. 1982). Bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) entwickelte sich bei Mg^{2+} -Mangel Nephrokalzinose (Cowey, Knox u.a. 1977) und führte zu verringerten Massezunahmen und geringeren Konzentrationen von Mg^{2+} in Plasma, Muskel- und Knochensubstanz (Knox, Cowey u.a. 1983). In einer Studie von Shim und Ng (1988) reagierten Guppies (*Poecilia reticulata* Peters) ebenfalls mit geringeren Wachstumsraten, höherer oder niedrigerer Futtermittelverwertungseffektivität und erhöhter Sterblichkeit. In einer Studie von Wendelaar Bonga, Löwik u.a. (1983) wurde bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen im Außenmedium beim Mosambik-Buntbarsch (*Oreochromis mossambicus*) Hypokaliämie festgestellt. Bei der

vorliegenden Studie konnten allerdings keine Effekte der Mg-Exposition auf den Ca^{2+} -Gehalt der Larven festgestellt werden.

Süßwasserfische leben normalerweise in einer hypokalzämischen Umgebung, wobei der primäre Aufnahmeweg für Ca^{2+} die Kiemen sind und der Darm nur der sekundäre Aufnahmeweg ist (Flik und Verbost 1993). Ein unnatürlich niedriges $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ -Verhältnis kann als Inhibitor des Ca^{2+} -Stoffwechsels wirken, da andere zweiwertige Ionen wie Cadmium und Mg^{2+} als physiologische Ca^{2+} -Blocker wirken können (Hardwick, Jones u.a. 1991). Die Bioakkumulation von Ca^{2+} bei der Entwicklung von Rohu-Larven (*Labeo rohita*) nimmt in einer Umgebung mit einer zunehmenden Konzentration von Alkali- und Erdalkalimetallen im Umgebungswasser zu (Mallick, Mohapatra u.a. 2010). In dieser Studie war der Ca^{2+} -Gehalt in der K und MgK signifikant geringer als in der NG. Die Cl^- - und SO_4^{2-} -Konzentrationen in diesen Medien unterschieden sich allerdings auch stark.

Die Knochensubstanz besteht bei Teleostiern hauptsächlich aus einer organischen Knochenmatrix, sogenannten Typ-I-Kollagenfasern und einer mineralischen Komponente, dem Calciumphosphat Hydroxylapatit (Simkiss und Wilbur 2012). Deformationen der Skelettstruktur werden bei Knochenfischen entweder neuromuskulär verursacht oder es werden die regulatorischen Prozesse der Ossifikation gestört (Divanach, Boglione u.a. 1996). Mineralien können die Knochenentwicklung positiv (wie Ca^{2+} und P) oder negativ (wie Strontium und Lithium) beeinflussen (Lall und Lewis-McCrea 2007). Die Hauptbestandteile von Fischknochen sind Ca^{2+} , Phosphate, Karbonate und geringe Mengen an Mg^{2+} , Na^+ und anderen Metallen (Lall und Lewis-McCrea 2007). Verglichen mit der F1-Generation wiesen die Embryonen und Larven von nicht exponierten Eltern einen höheren Anteil an Deformationen des Herz-Kreislauf-Systems, jedoch weniger Missbildungen der Wirbelsäule auf. Insbesondere bei der Mg^{2+} können Wirbelsäulendeformationen aufgrund eines niedrigen $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ -Verhältnisses entstehen. Die meisten natürlichen Gewässer haben ein $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ -Verhältnis > 1 (Naddy, Stubblefield u.a. 2002). In dieser Studie haben die Expositionen mit Mg als Komponente ein $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ -Verhältnis von ca. 0,25. Mg^{2+} als physiologischer Ca^{2+} -Blocker könnte in diesem Verhältnis die Knochenentwicklung und den Ossifizierungsprozess bei ZF-Embryonen beeinträchtigen. Es gibt aber auch Hinweise auf spontan auftretende Anhäufungen von Wirbelsäulenverformungen bei in Gefangenschaft aufgezogenen ZF (Piron 1978).

Der größte Anteil von Ca^{2+} ist bei Knochenfischen in der mineralischen Phase des Skeletts gebunden, welches sich hauptsächlich aus Ca^{2+} , Phosphaten und Karbonaten zusammensetzt, aber auch geringe Mengen an Mg^{2+} , Na, F, Sr und S enthält (Lall und Lewis-McCrea 2007). Die Knochensubstanz dient als Ca^{2+} -Reservoir z. B. bei Verlust von Schuppen (Weiss und Watabe 1978). Der metabolische Umsatz von Ca^{2+} findet aber hauptsächlich in Kiemen, Flossen und Oralepithel statt (Lall und Lewis-McCrea 2007). P kommt weder im Süß- noch im Meerwasser in ausreichender Menge vor und muss durch die Nahrung über das Gastro-intestinalepithel aufgenommen werden. Während der Ca^{2+} - und P-Anteil in der Trockenmasse der ZF-Proben hauptsächlich aus dem Skelett stammt, ist Mg^{2+} vorwiegend in der weichen Körpersubstanz und den Körperflüssigkeiten vorhanden. Ca^{2+} -Mangel kommt sowohl bei Süßwasser- als auch bei Meeresfischen in der Natur kaum vor. Phosphormangel tritt aufgrund geringer Phosphatgehalte in der Nahrung häufiger auf und kann zu Wachstumsschwäche, verminderter Knochenmineralisation und damit zu Skelettdeformationen führen (Roy, Witten u.a. 2002). In der vorliegenden Studie konnten keine signifikanten Effekte der Salzexpositionen auf den Phosphorgehalt der ZF festgestellt werden. Das $\text{Mg}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$ -Verhältnis war allerdings in der Mg erhöht. Außerdem wurde am Ende des ELST in der Mg im Vergleich zur Ktr und K ein signifikant niedrigeres Körperlängenwachstum festgestellt.

4.3.3 Herzfrequenzen

Mg^{2+} und K^{+} sind die funktionalen Kationen mit der höchsten Konzentration im Intrazellularraum und die Mg^{2+} - und K^{+} -Homöostase ist eng korreliert. Die Hauptfunktion von K^{+} besteht in der Aufrechterhaltung der Membranerregbarkeit von Nerven- und Muskelzellen. Das Ruhepotenzial der Membran wird dabei über die intra- und extrazelluläre K^{+} -Konzentration beeinflusst. Durch das Verhältnis von intra- zu extrazellulärem K^{+} wird das Ruhepotenzial verändert und die Erregbarkeit der Zelle gesteuert. Die intrazelluläre K^{+} -Konzentration muss dabei gegen den elektrochemischen Gradienten aufrechterhalten werden. Dieser Transport findet aktiv über $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -Pumpen statt. Dabei werden Na^{+} nach außen und K^{+} in das Zellinnere gepumpt. In Herzmuskelzellen ist das Ruhepotenzial nicht stabil und wird durch eine regelmäßige Spannungsumkehr unterbrochen. Durch passives Ausströmen von K^{+} entlang des elektrochemischen Gradienten findet eine Depolarisation statt (Tamargo, Caballero u.a. 2004). Nach einer kurzen Verzögerung der Plateauphase wird das Ruhepotenzial wiederhergestellt. Die Energie für die $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -Pumpe liefert ATP, welches über Mg^{2+} als Cofaktor gesteuert wird. Neben K^{+} und Na^{+} sind auch unterschiedliche Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentrationen für das Membranpotenzial wesentlich. Während im Zytosol K^{+} und

Mg^{2+} dominieren, herrschen Ca^{2+} und Na^+ außerhalb der Zelle vor. Mg^+ ist neben der Na^+/K^+ -Pumpe auch für die Funktion der $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ -Austauscher in der Zellmembran und der Ca^{2+} -Pumpen des Endoplasmatischen Retikulum notwendig (Schroll 1998). Mg^{2+} wurde im Zusammenhang mit Knochenfischen hauptsächlich unter dem Aspekt der Nahrungszusammensetzung und deren Wirkung auf das Körperwachstum untersucht (Knox, Cowey u.a. 1981, Satoh, Yamamoto u.a. 1983, Ogino und Chiou 1976). Demgegenüber werden kardiovaskuläre Erkrankungen in der Humanpathologie hauptsächlich mit Mg^{2+} -Mangel in Verbindung gebracht (Liao, Folsom u.a. 1998, Lim und Jacob 1972, Chakraborti, Chakraborti u.a. 2002). Steigende Salinität führte beim Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*) bis zu einer Höhe von 8 g/l zu Tachykardie, ab 12 g/l zu Brachykardie (Enayati, Peyghan u.a. 2013). In dieser Studie wurden signifikant höhere Herzschlagraten in allen Expositionen festgestellt, die erhöhte K^+ - und Mg^+ -Konzentrationen aufwiesen. Die Embryonen der HG, NG und MgK – bei letzterer allerdings nur bei 72 hpf – wiesen signifikant höhere Herzschlagfrequenzen (Tachykardie) auf als die Ktr. Es konnten keine Effekte in der Mg und K festgestellt werden.

4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Exposition adulter ZF mit hohen Salzionenkonzentrationen und -imbilanzen führten bei den meisten untersuchten Parametern zu transienten, eher geringen bis moderaten Effekten. Die Effekte wurden bei den Cortisolkonzentrationen, der Histologie von Kiemen und Gonaden, der mRNA-Expression von FSH und PRL sowie bei den relativen Konditionsfaktoren der Männchen festgestellt. Die Cortisolspiegel von HG und K waren nach sechs Wochen immer noch erhöht. Die ZF konnten sich in diesen Expositionen nicht vollständig an den Ionenstress gewöhnen. In den Kiemen aller Expositionsgruppen wurden strukturelle Veränderungen der Kiemen in Form einer Verdickung des Kiemenepithels festgestellt, wobei die Effekte moderat waren. Des Weiteren wurden bei den Reproduktionsparametern signifikante Größenunterschiede für Oozyten von MgK und K und erhöhte FSH-mRNA-Expressionsniveaus der Männchen in der NG nachgewiesen. Diese Ergebnisse könnten auf eine beschleunigte sexuelle Reifung unter Stress hinweisen. Die Effekte waren allerdings eher gering. Das verringerte Expressionsniveau der PRL-mRNA, dem Hormon der Süßwasseranpassung, kann ein Indikator für die hormonelle Anpassung an erhöhte Ionenkonzentrationen und -imbilanzen sein. Insgesamt hat die vorliegende Studie gezeigt, dass chronischer Ionenstress eher moderate, variable Effekte auf die Reproduktionsleistung und die Stressreaktion adulter ZF auslöst. Dem gegenüber stehen die deutlich stärkeren Effekte der

Salzexpositionen auf den reproduktiven Output und die Nachkommenschaft der exponierten Tiere.

Die Ergebnisse belegen eine starke Beeinträchtigung der Reproduktion und Embryonalentwicklung von *D. rerio* bei K⁺-reichen Abwässern. Cl⁻, Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺ und K⁺ in Konzentrationen der offiziellen Schwellenwerte führen zu einem signifikant höheren Anteil an unbefruchteten, verformten und koagulierten Eiern. Embryonen, die bis zum achten Tag exponiert waren, wiesen signifikant höhere Deformations- und Mortalitätsraten auf. Die erhöhten Ionenkonzentrationen führten auch zu verzögertem und vorzeitigem Schlupf. Der Hauptbestandteil im Ionengemisch, der für die Fortpflanzungs- und Entwicklungstoxizität verantwortlich ist, scheint Mg²⁺ und sein Einfluss auf den K-Haushalt, aber nicht K⁺ selbst zu sein.

Bei der Verknüpfung der Ergebnisse dieser Studie mit den tatsächlichen Auswirkungen der Einleitung von salzreichen Kaliabwässern in das Flusssystem sind weitere Faktoren zu beachten. Die Ergebnisse spiegeln nur die Auswirkungen von unnatürlichen Ionenungleichgewichten auf die Fortpflanzung von Fischen und ihre frühe Entwicklung wider. Vor Ort, also im abwasserbelasteten Gewässersystem, wirken vielfältige Cofaktoren, die die Effekte in komplexen Ökosystemen ebenfalls beeinflussen. Andere Schadstoffe, Schwankungen der Abwasserkonzentration und/oder eine gestörte Flussmorphologie können das Gewässer als Lebensraum für die Fortpflanzung von Fischen beeinträchtigen. ZF sind eine tropische, salztolerante und relativ robuste Art. Sie sind azyklische Dauerlaicher mit geringen Ansprüchen für eine erfolgreiche Reproduktion und einer hohen Fertilität und Fekundität. Einheimische Fische könnten aufgrund ihrer Toleranz gegenüber hypersalinen Bedingungen sowie der relativ kurzen Zeit und der saisonalen Abhängigkeit ihrer Fortpflanzung deutlich empfindlicher reagieren. Außerdem wirken unter natürlichen Bedingungen neben dem osmotischen Stress noch andere Stressoren wie Futtermangel oder Prädatorendruck.

Neben den Effekten auf den Nachwuchs (Schlupf, Mortalität und Deformationen sowie die Mineralienzusammensetzung des Körpers) besteht auch die Gefahr der Ausprägung einer prädiktiv adaptiven Reaktion (engl. predictive adaptive response = PAR). Fische verfügen über eine gewisse Plastizität bei der Ausprägung des Phänotyps. Diese findet nicht über genomische Veränderungen, sondern über epigenetische Mechanismen statt (Sun, Xu u.a. 2008). Dabei erfolgt die Ausprägung eines bestimmten Phänotyps nach einer Reihe von Umweltsignalen, die es dem Individuum ermöglicht, im späteren Umfeld höhere Überlebens-

chancen zu besitzen (Bateson 2001, Gluckman, Hanson u.a. 2005). Die Ausprägung von veränderten Phänotypen kann graduell, dichotom und mehr oder weniger reversibel sein. Unter ungünstigen, hier osmotischen, Umweltbedingungen kommt es zu einer adaptiven Reaktion. Der Erfolg bzw. die Fitness eines Individuums werden hierbei auch bei Verbesserung der Umweltbedingungen im Erwachsenenalter nicht zwingend besser. Erfolgversprechend ist vielmehr, dass die Umweltbedingungen im Erwachsenenalter mit dem Umweltkontext in der Entwicklungsphase und den dadurch entstandenen Phänotypausprägungen zusammenpassen (Bateson, Gluckman u.a. 2014). Im Falle von unphysiologischen sowie zeitlich und örtlich schwankenden Ionenkonzentrationen bedeutet das, vor allem für die Fischbrut, ein erhöhtes Risiko von Fehlanpassungen.

Nachteilige Effekte auf Süßwasserökosysteme infolge eines Ungleichgewichts anorganischer Ionen sind ein häufiges durch den Eintrag zahlreicher Industrie- und Bergbauabwässer verursachtes Problem (Cañedo-Argüelles, Kefford u.a. 2013). Die anthropogene Versalzung im Flusssystem Werra/Weser ist hinsichtlich hoher K^+ - und Mg^{2+} -Konzentrationen einzigartig. Bezüglich der Bedeutung von Faktoren, die für die Störung dieses Ökosystems des Flusses verantwortlich sind, gibt es unterschiedliche wissenschaftliche Bewertungen. Während Bäche und Coring (2011) die Bedeutung anderer Faktoren wie organischer und anorganischer Verschmutzung und der gestörten Hydromorphologie betonen, stellten Hübner (2007), Braukmann und Böhme (2011) sowie Arle und Wagner (2013) fest, dass der Salzgehalt und damit die hohen Konzentrationen an Begleitkationen der dominierende Faktor sind. Die hier vorgelegten Ergebnisse unterstreichen eindeutig die Bedeutung von Ionenungleichgewichten und der Gesamtionenkonzentration sowie deren mögliche negative Auswirkungen auf die Fortpflanzung von Süßwasserfischen. In der HG konnten de facto keine lebensfähigen Nachkommen von den exponierten Elterntieren gewonnen werden. Die zukünftigen gesetzlichen Grenzwerte von 1,7 g/l für Cl^- , 0,15 g/l für K^+ und 0,23 g/l für Mg^{2+} sind immer noch zu hoch, um als umweltverträglich für Fische eingestuft zu werden. Reproduktionstoxische Effekte wie das in der NG festgestellte Sterberisiko von mehr als 20 % und Deformationsraten von mehr als 30 % für die Nachkommen exponierter Elterntiere lassen die Bildung selbsterhaltender Populationen bei stenohalinen Fischen wahrscheinlich nicht zu.

Die Reproduktionstoxizität von K^+ - und Mg^{2+} -reichen Bergbauabwässern gegenüber Süßwasserökosystemen sollte unbedingt mit endemischen Spezies überprüft werden. Die Exposition mit den gleichen Ionenkonzentrationen und Ionenverhältnissen wie in dieser Studie führte bei adulten Plötzen (*Rutilus rutilus* L.) ebenfalls zu durch osmotischen Stress

Diskussion

induzierten transienten, eher moderaten Effekten (Baberschke, Irob u.a. 2019). Eine Überprüfung der Effekte der Salzexpositionen auf die Reproduktion und die Larval- und Embryonalentwicklung bei dieser Fischart könnte ähnlich wie bei *D. rerio* zu weitaus stärkeren und eindeutigeren Effekten führen. Einen entscheidenden Beitrag zum Wissensstand über die Reproduktionstoxizität von Kaliabwässern dürften auch vertiefende Studien zu den Wirkmechanismen bestimmter Ionenkonzentrationen und zu den Prozessen der Eihärtung, der Spermienbeweglichkeit und der Befruchtung erbringen.

5. Literatur

- Adriano, EA, Arana, S und Cordeiro, NS (2005): Histology, ultrastructure and prevalence of *Henneguya piaractus* (Myxosporea) infecting the gills of *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. *Diseases of aquatic organisms*, 64, S. 229-235.
- Alavi, SMH und Cosson, J (2006): Sperm motility in fishes.(II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biology International*, 30, S. 1-14.
- Albrecht, J (1984): Gewässerbelastung und Makroinvertebraten-Besiedlung im Weser-Flussgebiet (Fulda, Werra, Oberweser, Leine, Innerste), Eigenverlag.
- Albrecht, ML (1954): Die Wirkung der Kaliabwässer auf die Fauna der Werra und Wipper. *Zeitschrift für Fischerei und deren Hilfswissenschaften NF*, 3, S. 401-426.
- Alderdice, DF (1988): 3 Osmotic and Ionic Regulation in Teleost Eggs and Larvae. *Fish Physiology*, 11, S. 163-251
- Almeida, DV, de Martinez Gaspar Martins, C, de Azevedo Figueiredo, M, Lanes, CFC, Bianchini, A und Marins, LF (2013): Growth hormone transgenesis affects osmoregulation and energy metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *Transgenic Research*, 22, S. 75-88.
- Alsop, D und Vijayan, MM (2008): Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294, S. R711-R719.
- Aytekin, Y und Yüce, R (2008): Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51, S. 513-522.
- Baberschke, N, Irob, K, Preuer, T, Meinelt, T und Kloas, W (2019): Potash mining effluents and ion imbalances cause transient osmoregulatory stress, affect gill integrity and elevate chronically plasma sulfate levels in adult common roach, *Rutilus rutilus*. *Environmental Pollution*, 249, S. 181-190
- Bacher, GJ und Garnham, JS (1992): The effect of salinity to several freshwater aquatic species of southern Victoria, Freshwater Ecology Section, Department of Conservation and Environment. EPA Report SRS, 92/003
- Barton, Bruce A, Schreck, Carl B und Barton, Lesley D (1987): Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Dis. Aquat. Org*, 2, S. 173-185.
- Bateson, Patrick (2001): Fetal experience and good adult design. *International journal of epidemiology*, 30, S. 928-934.
- Bateson, P, Gluckman, P und Hanson, M (2014): The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptive Response hypothesis. *The Journal of physiology*, 592, S. 2357-2368.
- Bayly, IAE (1968): The occurrence of calanoid copepods in athalassic saline waters in relation to salinity and anionic proportions. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 17, S. 449-455.
- Berg, H, Modig, C und Olsson, P-E (2004): 17beta-estradiol induced vitellogenesis is inhibited by cortisol at the post-transcriptional level in Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2, S. 62.

Literatur

- Bhattacharya, H, Zhang, SC, Wang, YJ und Xu, YY (2006): Effects of salinity on embryogenesis and hatching of the rosy barb *Puntius conchonius* Hamilton 1822 (Cyprinidae). *Tropical Zoology*, 19, S. 111-118.
- Bijvelds, MJ, Van der Velden, JA, Kolar, ZI und Flik, G (1998): Magnesium transport in freshwater teleosts. *Journal of Experimental Biology*, 201, S. 1981-90.
- Bijvelds, Marcel JC, Kolar, ZI und Flik, G (2001): Electrodiffusive magnesium transport across the intestinal brush border membrane of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *The FEBS Journal*, 268, S. 2867-2872.
- Billman, EJ und Belk, MC (2014): Effect of age-based and environment-based cues on reproductive investment in *Gambusia affinis*. *Ecology and evolution*, 4, S. 1611-1622.
- Boeuf, G und Payan, P (2001): How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130, S. 411-423.
- Wendelaar Bonga, SE (1997): The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77, S. 591-625.
- Brand, M, Granato, M und Nüsslein-Volhard, C (2002): Keeping and raising zebrafish. *Zebrafish*, 261, S. 7-37.
- Braukmann, U und Böhme, D (2011): Salt pollution of the middle and lower sections of the river Werra (Germany) and its impact on benthic macroinvertebrates. *Limnologia*, 41, S. 113-124.
- Brown, PS und Brown, SC (2014): Osmoregulatory actions of prolactin and other adenohypophysial hormones. *Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications*, 2, S. 45-84.
- Campbell, PM, Pottinger, TG und Sumpter, JP (1992): Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biology of reproduction*, 47, S. 1140-1150.
- Canavello, PR, Cachat, JM, Beeson, E, Laffoon, AL, Grimes, C, Haymore, W, Elegante, MF, Bartels, BK, Hart, PC und Elkhayat, SI (2011): Measuring endocrine (cortisol) responses of zebrafish to stress. *Zebrafish neurobehavioral protocols*, S. 135-142.
- Cañedo-Argüelles, M, Kefford, BJ, Piscart, C, Prat, N, Schäfer, RB und Schulz, C-J (2013): Salinisation of rivers: an urgent ecological issue. *Environmental pollution*, 173, S. 157-167.
- Carragher, JF, Sumpter, JP, Pottinger, TG und Pickering, AD (1989): The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson. *General and comparative endocrinology*, 76, S. 310-321.
- Castranova, DA, King, W, Woods, LC (2005): The effects of stress on androgen production, spermiation response and sperm quality in high and low cortisol responsive domesticated male striped bass. *Aquaculture*, 246, S. 413-422.
- Chakraborti, S, Chakraborti, T, Mandal, M, Mandal, A, Das, S und Ghosh, S (2002): Protective role of magnesium in cardiovascular diseases: a review. *Molecular and cellular biochemistry*, 238, S. 163-179.
- Chen, J (2013): Impaired cardiovascular function caused by different stressors elicits a common pathological and transcriptional response in zebrafish embryos. *Zebrafish*, 10, S. 389-400.
- Cheng, J, Flahaut, E und Cheng, SH (2007): Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, S. 708-716.

- Chotipuntu, P (2003): Salinity sensitivity in early life stages of an Australian freshwater fish, Murray cod (*Maccullochella peelii peelii* Mitchell 1838), University of Canberra.
- Clearwater, SJ und Pankhurst, NW (1997): The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleost, red gurnard. *Journal of fish biology*, 50, S. 429-441.
- Consoli, F, Allen, D, Boustead, I, Fava, J, Franklin, W, Jensen, A, Oude, N, Parrish, R, Perriman, R und Postlethwaite, D (1993): SETAC-Society of Environmental Toxicology and Chemistry, (1993). Guidelines for Life-Cycle Assessment: A "Code of Practice.
- Consten, D, Bogerd, J, Komen, J, Lambert, JGD und Goos, HJT (2001): Long-Term Cortisol Treatment Inhibits Pubertal Development in Male Common Carp, *Cyprinus carpio* L 1. *Biology of reproduction*, 64, S. 1063-1071.
- Consten, D, Lambert, JGD, Komen, H und Goos, HJT (2002): Corticosteroids Affect the Testicular Androgen Production in Male Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) 1. *Biology of Reproduction*, 66, S. 106-111.
- Contreras-Sanchez, WM, Schreck, CB, Fitzpatrick, MS und Pereira, CB (1998): Effects of stress on the reproductive performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction*, 58, S. 439-447.
- Cosson, J (2004): The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International*, 12, S. 69-85.
- Cosson, M-P, Cosson, J und Billard, R (1991): Synchronous triggering of trout sperm is followed by an invariable set sequence of movement parameters whatever the incubation medium. *Cell motility and the cytoskeleton*, 20, S. 55-68.
- Coward, K, Bromage, NR und Little, DC (1998): Inhibition of spawning and associated suppression of sex steroid levels during confinement in the substrate-spawning *Tilapia zillii*. *Journal of Fish Biology*, 52, S. 152-165.
- Cowey, CB, Knox, D, Adron, JW, George, S und Pirie, B (1977): The production of renal calcinosis by magnesium deficiency in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*, 38, S. 127-135.
- Dabrowska, H, Meyer-Burgdorff, KH und Gunther, K-D (1991): Magnesium status in freshwater fish, common carp (*Cyprinus carpio*, L.) and the dietary protein-magnesium interaction. *Fish Physiology and Biochemistry*, 9, S. 165-172.
- Darrow, KO und Harris, WA (2004): Characterization and development of courtship in zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish*, 1, S. 40-45.
- Degani, G, Yom-Din, S, Goldberg, D und Jackson, K (2010): cDNA cloning of blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) prolactin and its expression during the gonadal cycles of males and females. *Journal of endocrinological investigation*, 33, S. 7-12.
- Divanach, P, Boglione, C, Menu, M, Kounoundouros, G, Kentouri, M, Cataudella S (1996): Abnormalities in finfish mariculture: an overview of the problem, causes and solutions. In: *Sea bass and Sea bream culture: problems and prospects*, S. 45-66. Verona, Italien: European Aquaculture Society
- Dolmetsch, RE, Xu, Keli und Lewis, RS (1998): Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, 392, S. 933.

Literatur

- Dunlop, J, McGregor, G und Horrigan, N (2005): Potential impacts of salinity and turbidity in riverine ecosystems. The State of Queensland, 72.
- Dunn, OJ (1964): Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*, 6:3, S. 241-252.
- Eaton, RC und Farley, RD (1974): Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the laboratory. *Copeia*, 1974(1), S. 195-204.
- Ebeling, G (1933): Ergebnisse der fischereibiologischen und fischereichemischen Untersuchung von Kaliabwässern. *Vom Wasser*, 68, S. 272-288.
- Enayati, A, Peyghan, R, Papahn, AA und Khadjeh, G-H (2013): Study on effect of salinity level of water on electrocardiogram and some of blood serum minerals in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*, 4(1), S. 49-53.
- Espinoza-Quiñones, FR, Módenes, AN, Palácio, SM, Szymanski, N, Welter, RA, Rizzutto, MA, Borba, CE und Kroumov, AD (2010): Evaluation of trace element levels in muscles, liver and gonad of fish species from São Francisco River of the Paraná Brazilian state by using SR-TXRF technique. *Applied Radiation and Isotopes*, 68, S. 2202-2207.
- Evans, DH (2008): Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295, S. R704-R713.
- Evans, DH, Piermarini, PM und Choe, KP (2005): The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85, S. 97-177.
- Flatman, PW (1991): Mechanisms of magnesium transport. *Annual Review of Physiology*, 53, S. 259-271.
- Flik, G und Verboost, PM (1993): Calcium transport in fish gills and intestine. *The Journal of Experimental Biology*, 184, S. 17-29.
- Flik, G, Van der Velden, JA, Dechering, KJ, Verboost, PM, Schoenmakers, TJM, Kolar, ZI und Bonga, SE (1993): Ca^{2+} and Mg^{2+} transport in gills and gut of tilapia, *Oreochromis mossambicus*: a review. *Journal of Experimental Zoology*, 265, S. 356-365.
- Gatlin, DM, Robinson, EH, Poe, WE und Wilson, RP (1982): Magnesium requirement of fingerling channel catfish and signs of magnesium deficiency. *The Journal of nutrition*, 112, S. 1182-1187.
- Gluckman, PD, Hanson, MA, Spencer, HG und Bateson, P (2005): Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 272, S. 671-677.
- Goodfellow, WL, Ausley, LW, Burton, DT, Denton, DL, Dorn, PB, Grothe, DR, Heber, MA, Norberg-King, TJ und Rodgers, JH (2000): Major ion toxicity in effluents: a review with permitting recommendations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, S. 175-182.
- Goolish, EM und Okutake, K (1999): Lack of gas bladder inflation by the larvae of zebrafish in the absence of an air-water interface. *Journal of fish biology*, 55, S. 1054-1063.
- Hall, LW und Anderson, RD (1995): The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota. *Critical Reviews in Toxicology*, 25, S. 281-346.

- Halsband, E (1973): Die Auswirkung extrem niedriger Wasserführung in regenarmen Jahren auf das stoffwechsel-physiologische Verhalten der Fische: dargestellt am Beispiel der Weser in den Jahren 1971/1972 (The impact of an extremely low discharge in dry years on the metabolic behaviour of fishes: depicting the Weser river in the years 1971/1972 as an example). Archiv für Fischereiwissenschaft, 24, S. 95-103.
- Halsband E (1976): Untersuchungen über den Krankheitszustand der in der Weser lebenden Fische (Investigations on the medical condition of the Weser river dwelling fishes). Informationen für die Fischwirtschaft, 23, 173–175.
- Hardwick, LL, Jones, MR, Brautbar, N und Lee, DB (1991): Magnesium absorption: mechanisms and the influence of vitamin D, calcium and phosphate. The Journal of Nutrition, 121, S. 13-23.
- Hart, BT, Bailey, P, Edwards, R, Hortle, K, James, K, McMahon, A, Meredith, C und Swadling, K (1991): A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota. Hydrobiologia, 210, S. 105-144.
- Harvey, B, Kelley, RN und Ashwood-Smith, MJ (1983): Permeability of intact and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. Cryobiology, 20, S. 432-439.
- Hegab, SA und Hanke, W (1984): The significance of cortisol for osmoregulation in carp (*Cyprinus carpio*) and tilapia (*Sarotherodon mossambicus*). General and comparative endocrinology, 54, S. 409-417.
- Herndon, TM, McCormick, SD und Bern, HA (1991): Effects of prolactin on chloride cells in opercular membrane of seawater-adapted tilapia. General and comparative endocrinology, 83, S. 283-289.
- Herrmann, K (1993): Effects of the anticonvulsant drug valproic acid and related substances on the early development of the zebrafish (*Brachydanio Rerio*). Toxicology in vitro, 7, S. 41-54.
- Hisaoka, KK (1958): Microscopic studies of the teleost chorion. Transactions of the American Microscopical Society, 77, S. 240-243.
- Horseman ND (1989): Models of prolactin action in nonmammalian vertebrates. In: Rillema JA (Hrsg.), *Actions of Prolactin on Molecular Processes*. S. 41–67. CRC Press.
- Hoshijima, K und Hirose, S (2007): Expression of endocrine genes in zebrafish larvae in response to environmental salinity. Journal of Endocrinology, 193, S. 481-491.
- Hübner, G (2002): Die historische Fischfauna der unteren Werra. Philippia, 10(2). S. 119-129. Kassel.
- Hübner, G (2007): Ökologisch-faunistische Fließgewässerbewertung am Beispiel der salzbelasteten unteren Werra und ausgewählter Zuflüsse. Dissertationsschrift, Universität Kassel, Witzenhausen.
- Hurk, R, Schoonen, WGEJ, Van Zoelen, GA und Lambert, JGD (1987): The biosynthesis of steroid glucuronides in the testis of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, and their pheromonal function as ovulation inducers. General and comparative endocrinology, 68, S. 179-188.
- Jeney, G, Galeotti, M, Volpatti, D, Jeney, Z und Anderson, DP (1997): Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture, 154, S. 1-15.
- Jentoft, S, Aastveit, AH, Torjesen, PA und Andersen, Ø (2005): Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated

- rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 141, S. 353-358.
- Johnson, R, Wolf, J und Braunbeck, T (2009): OECD guidance document for the diagnosis of endocrine-related histopathology of fish gonads. Organisation for Economic Co-operation and Development, 96 S.
- Kammerer, BD, Cech Jr, JJ und Kültz, D (2010): Rapid changes in plasma cortisol, osmolality, and respiration in response to salinity stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 157, S. 260-265.
- Kefford B, Dunlop JD, Choy S (2007) Understanding salinity thresholds in freshwater biodiversity: freshwater to saline transition. In: Lovett S, Price P, B Edgar, (Hrsg.), *Salt, nutrient, sediment and interactions: findings from the national river contaminants program*. S. 9-28. Land & Water Australia.
- Khong, HK, Kuah, MK, Jaya-Ram, A und Shu-Chien, AC (2009): Prolactin receptor mRNA is upregulated in discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) skin during parental phase. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 153, S. 18-28.
- Kimmel, CB, Ballard, WW, Kimmel, SR, Ullmann, B und Schilling, TF (1995): Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental dynamics, 203, S. 253-310.
- Kleine, B und Rossmannith, W (2007): Hormone und Hormonsystem. Springer, Berlin und Heidelberg.
- Knox, D, Cowey, CB und Adron, JW (1981): Studies on the nutrition of salmonid fish. The magnesium requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). British Journal of Nutrition, 45, S. 137-148.
- Knox, D, Cowey, CB und Adron, JW (1983): Studies on the nutrition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Magnesium deficiency: the effect of feeding with a Mg-supplemented diet. British Journal of Nutrition, 50, S. 121-127.
- Krasznai, Z, Márián, T, Balkay, L, Gáspár, R und Trón, L (1995): Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. Aquaculture, 129, S. 123-128.
- Krasznai, Z, Márián, T, Izumi, H, Damjanovich, S, Balkay, L, Trón, L und Morisawa, M (2000): Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca^{2+} channels, leading to Ca^{2+} influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97, S. 2052-2057.
- Krasznai, Z, Morisawa, M, Morisawa, S, Krasznai, ZT, Trón, L, Gáspár, R und Márián, T (2003): Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. Aquatic Living Resources, 16, S. 445-449.
- Kültz, D. und Onken, H (1993): Long-term acclimation of the teleost *Oreochromis mossambicus* to various salinities: two different strategies in mastering hypertonic stress. Marine Biology, 117, S. 527-533.
- Kwok, HF, So, WK, Wang, Y und Ge, W (2005): Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors—evidence for their distinct functions in follicle development. Biology of reproduction, 72, S. 1370-1381.

- Laale, HW (1977): The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *Journal of Fish Biology*, 10, S. 121-173.
- Laiz-carrión, R, Martín Del Río, MP, Miguez, JM, Mancera, JM und Soengas, JL (2003): Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 298, S. 105-118.
- Lall, SP und Lewis-McCrea, LM (2007): Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish—an overview. *Aquaculture*, 267, S. 3-19.
- Lawrence, C (2007): The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquaculture*, 269, S. 1-20.
- Lee, KW, Webb, SE und Miller, AL (1999): A wave of free cytosolic calcium traverses zebrafish eggs on activation. *Developmental biology*, 214, S. 168-180.
- Leino, RL, Jensen, KM und Ankley, GT (2005): Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental toxicology and pharmacology*, 19, S. 85-98.
- Liao, F, Folsom, AR und Brancati, FL (1998): Is low magnesium concentration a risk factor for coronary heart disease? The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *American heart journal*, 136, S. 480-490.
- Lim, P und Jacob, E (1972): Magnesium deficiency in patients on long-term diuretic therapy for heart failure. *British Medical Journal*, 3, S. 620-622.
- Lin, SW und Ge, W (2009): Differential regulation of gonadotropins (FSH and LH) and growth hormone (GH) by neuroendocrine, endocrine, and paracrine factors in the zebrafish — an *in vitro* approach. *General and comparative endocrinology*, 160, S. 183-193.
- Lindsay, LAL, Hertzler, PL und Clark Jr, WH (1992): Extracellular Mg^{2+} induces an intracellular Ca^{2+} wave during oocyte activation in the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Developmental biology*, 152, S. 94-102.
- Lu, Xg, Richard, MK, Murphy, MB, Lau, K und Wu, RSS (2014): Hypoxia disrupts gene modulation along the brain–pituitary–gonad (BPG)–liver axis. *Ecotoxicology and environmental safety*, 102, S. 70-78.
- Lutz, I, Kloas, W, Springer, TA, Holden, LR, Wolf, JC, Krueger, HO und Hosmer, AJ (2008): Development, standardization and refinement of procedures for evaluating effects of endocrine active compounds on development and sexual differentiation of *Xenopus laevis*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 390, S. 2031-2048.
- Madsen, SS, Jensen, MK, Nhr, J und Kristiansen, K (1995): Expression of Na^{+} - K^{+} -ATPase in the brown trout, *Salmo trutta*: in vivo modulation by hormones and seawater. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 269, S. R1339-R1345.
- Mallatt, J (1985): Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42, S. 630-648.
- Mallick, A, Mohapatra, BC und Sarangi, N (2010): Bioaccumulation of sodium, potassium, calcium and magnesium in Rohu, *Labeo rohita* (Ham.) fry. *Current World Environment*, 5, S. 111-116.
- Mangor-Jensen A (1986) Osmoregulation in eggs and larvae of the cod (*Gadus morhua* L.): basic studies and effects of oil exposure. In: Fyhn HJ (Hrsg.), *Fish larval physiology and anatomy*. S. 117-166. University of Bergen.

Literatur

- Mangor-Jensen, A (1987): Water balance in developing eggs of the cod *Gadus morhua* L. Fish physiology and biochemistry, 3, S. 17-24.
- Manzon, LA (2002): The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. General and comparative Endocrinology, 125, S. 291-310.
- Marshall, NA und Bailey, Paul CE (2004): Impact of secondary salinisation on freshwater ecosystems: effects of contrasting, experimental, short-term releases of saline wastewater on macroinvertebrates in a lowland stream. Marine and Freshwater Research, 55, S. 509-523.
- Matthes, U und Werner, R, (2012): *Elektrobefischungen von Abschnitten der Werra zwischen Breitungen und Creuzburg im Jahr 2011*. Bericht über den Fischbestand der Werra unter Berücksichtigung der Einleitung von Kaliabwässern. Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES).
file:///D:/Benutzer/Wagler/Downloads/werrabercopy%20(6) .pdf
- Matthews, M und Varga, M (2012): Anesthesia and euthanasia in zebrafish. Ilar Journal, 53, S. 192-204.
- McClure, MM, McIntyre, PB und McCune, AR (2006): Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. Journal of Fish Biology, 69, S. 553-570.
- McCormick, SD (1990): Cortisol directly stimulates differentiation of chloride cells in tilapia opercular membrane. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 259, S. R857-R863.
- McCormick, SD (1995): 11 Hormonal Control of Gill Na⁺, K⁺-ATPase and Chloride Cell Function. Fish physiology, 14, S. 285-315.
- McCormick, SD (2001): Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. American zoologist, 41, S. 781-794.
- McDonald D.G., Wood C.M. (1993) Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin J.C., Jensen F.B. (Hrsg.), *Fish Ecophysiology. Chapman & Hall Fish and Fisheries Series*, S. 297-321. Springer.
- Meinelt, T und Stüber, A (2009): Toxizität von Kaliabwässern gegen juvenile Fische. Artenschutzreport, 22, S. 10-12
- Milla, S, Wang, N, Mandiki, SNM und Kestemont, P (2009): Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 153, S. 242-251.
- Mommsen, TP, Vijayan, MM und Moon, TW (1999): Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 9, S. 211-268.
- Morehead, DT, Ritar, AJ und Pankhurst, NW (2000): Effect of consecutive 9-or 12-month photothermal cycles and handling on sex steroid levels, oocyte development, and reproductive performance in female striped trumpeter *Latris lineata* (Latrididae). Aquaculture, 189, S. 293-305.
- Mount, DR., Gulley, DD., Hockett, JR, Garrison, TD. und Evans, JM (1997): Statistical models to predict the toxicity of major ions to *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* and *Pimephales promelas* (fathead minnows). Environmental Toxicology and Chemistry, 16, S. 2009-2019.

- Naddy, RB, Stubblefield, WA, May, JR, Tucker, SA und Hockett, JR (2002): The effect of calcium and magnesium ratios on the toxicity of copper to five aquatic species in freshwater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, S. 347-352.
- Nagahama, Y und Yamashita, M (2008): Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, growth & differentiation*, 50, S. S195-S219.
- Nagel, R (2002): DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX*, 19, S. 38-48.
- Nemenz, H (1970): Ionenverhältnisse und die Besiedlung hyperhaliner Gewässer, besonders durch Insekten. *Acta biotheoretica*, 19, S. 148-170.
- Nero, V, Farwell, A, Lee, LEJ, Van Meer, T, MacKinnon, MD und Dixon, DG (2006): The effects of salinity on naphthenic acid toxicity to yellow perch: gill and liver histopathology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, S. 252-264.
- Neumann, D (1962): Die Analyse limitierender Ionenwirkungen bei Meeres- und Süßwassertieren mit Hilfe ökologischer, physiologischer und züchterischer Methoden. *Kieler Meeresforschungen* 18, S. 38-54
- Nguyen, N (2010): *Prolactin function in zebrafish development*. Dissertationsschrift, East Carolina University. <http://hdl.handle.net/10342/3573>
- Nielsen, DL, Brock, MA, Rees, GN und Baldwin, DS (2003): Effects of increasing salinity on freshwater ecosystems in Australia. *Australian Journal of Botany*, 51, S. 655-665.
- Nishioka, RS, de Jesus, EGT und Hyodo, S (1993): Localization of mRNAs for a pair of prolactins and growth hormone in the tilapia pituitary using in situ hybridization with oligonucleotide probes. *General and comparative endocrinology*, 89, S. 72-81.
- Nowak, B (1992): Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. *Aquatic toxicology*, 23, S. 65-83.
- OECD Test No. 230: 21-day Fish Assay, OECD Publishing.
- Oertli, HJ (1964): The Venice System for the classification of marine waters according to salinity. *Publicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, 33, S. 611.
- Ogino, C und Chiou, JY (1976): Mineral requirement in fish--Magnesium requirement of carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 41, S. 71-75.
- Peterson, RH, Martin-Robichaud, DJ und Power, J (1988): Toxicity of potash brines to early developmental stages of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 41, S. 391-397.
- Piato, ÂL, Capiotti, KM, Tamborski, AR, Oses, JP, Barcellos, LJG, Bogo, MR, Lara, DR, Vianna, MR und Bonan, CD (2011): Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35, S. 561-567.
- Pickering, AD und Pottinger, TG (1989): Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish physiology and biochemistry*, 7, S. 253-258.

Literatur

- Piron, RD (1978): Spontaneous skeletal deformities in the Zebra Danio (*Brachydanio rerio*) bred for fish toxicity tests. *Journal of Fish Biology*, 13, S. 79-83.
- Poleksić, V und Karan, V (1999): Effects of trifluralin on carp: biochemical and histological evaluation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 43, S. 213-221.
- Porter T.E., El Halawani M.E. (2001): Regulation of Lactotrophs and Prolactin Secretion in Non-mammalian Vertebrates. In: Horseman N.D. (Hrsg.), *Prolactin. Endocrine Updates*. S. 63-79. Springer.
- Pottinger, TG, Pickering, AD und Hurley, MA (1992): Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 103, S. 275-289.
- Ramsay, JM, Feist, GW, Varga, ZM, Westerfield, M, Kent, ML und Schreck, CB (2006): Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture*, 258, S. 565-574.
- Redondo-Müller, C, Cosson, M-P, Cosson, J und Billard, R (1991): In vitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa. *Molecular reproduction and development*, 29, S. 259-270.
- Reinecke, Md, Björnsson, BT, Dickhoff, WW, McCormick, SD, Navarro, I, Power, DM und Gutiérrez, J (2005): Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: Where we are and where to go. *General and comparative endocrinology*, 142, S. 20-24.
- Rombough, P (2002): Gills are needed for ionoregulation before they are needed for O₂ uptake in developing zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Experimental Biology*, 205, S. 1787-1794.
- Roy, PK, Witten, PE, Hall, BK und Lall, SP (2002): Effects of dietary phosphorus on bone growth and mineralisation of vertebrae in haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 27, S. 35-48.
- Roy, RL, Ruby, SM, Idler, DR und So, Y (1990): Plasma vitellogenin levels in pre-spawning rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during acid exposure. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 19, S. 803-806.
- Sakamoto, T und Hirano, T (1991): Growth hormone receptors in the liver and osmoregulatory organs of rainbow trout: characterization and dynamics during adaptation to seawater. *Journal of Endocrinology*, 130, S. 425-433.
- Sakamoto, T und McCormick, SD (2006): Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *General and comparative endocrinology*, 147, S. 24-30.
- Sardella, BA, Matey, V, Cooper, J, Gonzalez, RJ und Brauner, CJ (2004): Physiological, biochemical and morphological indicators of osmoregulatory stress in California Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. urolepis hornorum*) exposed to hypersaline water. *Journal of Experimental Biology*, 207, S. 1399-1413.
- Satoh, S, Yamamoto, H, Takeuchi, T und Watanabe, T (1983): Effects on growth and mineral composition of carp of deletion of trace elements [zinc, manganese, copper, cobalt] or magnesium from fish meal diet. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* (Japan).
- Sawant, MS, Zhang, S und Li, L (2001): Effect of salinity on development of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Current science*, 81, S. 1347-1349.

- Schmitz, W und Kneissl, I (1967): Die Salzgehaltstoleranz von *Gammarus pulex pulex* (L.), *Gammarus tigrinus* Sexton und *Asellus aquaticus* (L.) in Abhängigkeit von der relativen Konzentration der Kationen Na, Mg, K und Ca. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie, 52, S. 589-616.
- Schreck, Carl B (2010): Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. General and comparative endocrinology, 165, S. 549-556.
- Schreck, CB, Contreras-Sanchez, W und Fitzpatrick, MS (2001): Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. Aquaculture, 197, S. 3-24.
- Schroll, A (1998): Importance of magnesium for the electrolyte homeostasis—an overview. In: Smetana R (Hrsg.), *Advances in Magnesium Research: Magnesium in Cardiology: Proceedings of the 5th European Congress on Magnesium*, S. 463-72. London, England: John Libbey.
- Schwevers, U, Adam, B und Engler, O (2005): Fischökologische Untersuchungen der hessischen Anteile der Fließgewässersysteme von Weser und Werra, Band III. Institut für angewandte Ökologie. Hessen Forst, Kirtorf-Wahlen.
- Seidelin, M, Madsen, SS, Byrialsen, A und Kristiansen, K (1999): Effects of insulin-like growth factor-I and cortisol on Na⁺, K⁺-ATPase expression in osmoregulatory tissues of brown trout (*Salmo trutta*). General and comparative endocrinology, 113, S. 331-342.
- Shahriari Moghadam, M, Abtahi, B, Mosafer Khorjistan, S und Bitaab, MA (2013): Salinity tolerance and gill histopathological alterations in *Liza aurata* Risso, 1810 (*Actinopterygii: Mugilidae*) fry. Italian Journal of Zoology, 80, S. 503-509.
- Shepherd, BS, Sakamoto, T, Hyodo, S, Nishioka, RS, Ball, C, Bern, HA und Grau, EG (1999): Is the primitive regulation of pituitary prolactin (tPRL177 and tPRL188) secretion and gene expression in the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) hypothalamic or environmental? Journal of Endocrinology, 161, S. 121-129.
- Shim, KF und Ng, SH (1988): Magnesium requirement of the guppy (*Poecilia reticulata* Peters). Aquaculture, 73, S. 131-141.
- Simkiss, K und Wilbur, KM (2012): *Biom mineralization*. Elsevier, San Diego.
- Smolders, R, Bervoets, L, De Boeck, G und Blust, R (2002): Integrated condition indices as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). Environmental toxicology and chemistry, 21, S. 87-93.
- Sohn, YC, Yoshiura, Y, Kobayashi, M und Aida, K (1998): Effect of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin I and II subunits in the goldfish *Carassius auratus*. Fisheries science, 64, S. 715-721.
- Spence, R, Fatema, MK, Ellis, S, Ahmed, ZF und Smith, C (2007): Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. Journal of Fish Biology, 71, S. 304-309.
- Spence, R, Ashton, R und Smith, C (2007): Oviposition decisions are mediated by spawning site quality in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*. Behaviour, 144, S. 953-966.
- Spence, R und Smith, C (2006): Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance. Behavioral Ecology, 17, S. 779-783.

Literatur

- Steenbergen, PJ, Richardson, MK und Champagne, DL (2011): The use of the zebrafish model in stress research. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35, S. 1432-1451.
- Sun, XJ, Xu, PF, Zhou, T, Hu, M, Fu, CT, Zhang, Y, Jin, Y, Chen, Y, Chen, SJ und Huang, QH (2008): Genome-wide survey and developmental expression mapping of zebrafish SET domain-containing genes. *PloS one*, 3(1), e1499.
- Swanson, C (1998): Interactive effects of salinity on metabolic rate, activity, growth and osmoregulation in the euryhaline milkfish (*Chanos chanos*). *Journal of Experimental Biology*, 201, S. 3355-3366.
- Swanson, P, Dickey, JT und Campbell, B (2003): Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and biochemistry*, 28, S. 53-59.
- Tamargo, J, Caballero, R, Gómez, R, Valenzuela, C und Delpón, E (2004): Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovascular research*, 62, S. 9-33.
- Varsamos, S, Nebel, C und Charmantier, G (2005): Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141, S. 401-429.
- Velando, A, Drummond, H und Torres, R (2006): Senescent birds redouble reproductive effort when ill: confirmation of the terminal investment hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 273, S. 1443-1448.
- Velasco-Santamaría, YM und Cruz-Casallas, PE (2008): Behavioural and gill histopathological effects of acute exposure to sodium chloride in moneta (*Metynnis orinocensis*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25, S. 365-372.
- Vogel, JH (1913): *Die Abwässer aus der Kaliindustrie: ihre Beseitigung sowie ihre Einwirkung in und an den Wasserläufen*. Verlag Borntraeger, Berlin.
- Wagner, (2009): *Der ökologische Zustand des Makrozoobenthos der Mittleren und Unteren Werra und seine Haupteinflussfaktoren*. Abschlussbericht. Institut für Gewässerökologie und Fischereibiologie (IGF), Jena.
- Weiss, RE und Watabe, N (1978): Studies on the biology of fish bone—I. Bone resorption after scale removal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 60, S. 207-211.
- Weltzien, FA, Andersson, E, Andersen, Ø, Shalchian-Tabrizi, K und Norberg, B (2004): The brain–pituitary–gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 137, S. 447-477.
- Wendelaar Bonga, SE (1997): The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77, S. 591-625.
- Wendelaar Bonga, SE, Löwik, CJM und Van der Meij, JCA (1983): Effects of external Mg^{2+} and Ca^{2+} on branchial osmotic water permeability and prolactin secretion in the teleost fish *Sarotherodon mossambicus*. *General and comparative endocrinology*, 52, S. 222-231.
- Whiterod, NR, Walker, KF (2006) Will rising salinity in the Murray-Darling Basin affect common carp (*Cyprinus carpio* L.)?. *Marine and Freshwater Research*, 57, S. 817-823.
- Whittington, CM und Wilson, AB (2013): The role of prolactin in fish reproduction. *General and comparative endocrinology*, 191, S. 123-136.

- Williams, WD und Sherwood, JE (1994): Definition and measurement of salinity in salt lakes. International Journal of Salt Lake Research, 3, S. 53-63.
- Wood, CM (2017): Toxic responses of the gill, Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. CRC Press.
- Wood, CM, McDonald, DG und McMahon, BR (1982): The influence of experimental anaemia on blood acid-base regulation in vivo and in vitro in the starry flounder (*Platichthys stellatus*) and the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Experimental Biology, 96, S. 221-237.
- Xu, H, Liu, E, Li, Y, Li, X und Ding, C (2017): Transcriptome Analysis Reveals Increases in Visceral Lipogenesis and Storage and Activation of the Antigen Processing and Presentation Pathway during the Mouth-Opening Stage in Zebrafish Larvae. International Journal of Molecular Sciences, 18, S. 1634.
- Yaron, ZVI, Gur, GAL, Melamed, P, Rosenfeld, H, Elizur, A und Levavi-Sivan, B (2003): Regulation of fish gonadotropins. International review of cytology, 225, S. 131-185.
- Zhou, R, Tsang, AHK, Lau, SW und Ge, W (2011): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors in the zebrafish ovary: evidence for potentially dual roles of PACAP in controlling final oocyte maturation. Biology of reproduction, 85, S. 615-625.
- Zohar, Y, Muñoz-Cueto, JA, Elizur, A und Kah, O (2010): Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. General and comparative endocrinology, 165, S. 438-455.